# EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND



UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
JAN 8 '59


SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS


G. Wittig: Ergebnisse und Probleme der organischen Anionochemie . . . . . 389

*Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

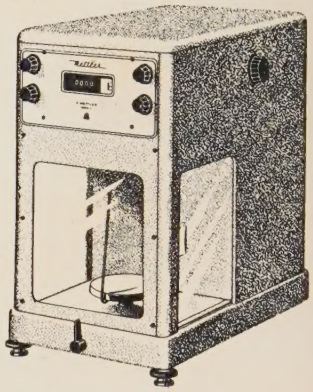
W. Nowacki, H. Koyama und M. H. Mladeck: Über die Kristallstruktur des Zeolithes Chabasit . . . . . 396
P. Lacroix, R. Ponlot et A. Dhem: Recalcification *in vitro* de l'os compact décalcifié . . . . . 396
A. Hofmann, A. Frey, H. Ott, Th. Petrzilka und F. Troxler: Konstitutionsaufklärung und Synthese von Psilocybin . . . . . 397
E. Niadas et L. Robert: Cinétique de l'inhibition de l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique par certains complexants . . . . . 399
G. Gonda and L. Magos: Mast Cell Destruction Caused by Distilled Water . . . . . 401
J. Jacob and J. L. Sirlin: Labelling of Insect Spermatozoa by Adenine-8-$^{14}$C . . . . . 402
K. C. Kanwar: What Constitutes a Network in the Acinar Cells of Amphibian and Mammalian Pancreas? . . . 403
J. Truffert, J. L. de Gennes, L. Robert et J. Polonovski: Sur l'interaction de la Protamine avec des protéines sériques . . . . . 404
A. Locker: Ein Beitrag zur irreversiblen Temperaturinaktivierung der Gewebsatmung . . . . . 406
A. Locker: Zur Temperaturaktivierung der Substratatmung tierischer Gewebe . . . . . 407
E. Kivalo, U. K. Rinne, and S. Mäkelä: Acetycholinesterase, Acid Phosphatase, and Succinic Dehydrogenase in the Hypothalamic Magnocellular Nuclei after Serotonin Administration . . . . . 408
P. Manigault and Ch. Stoll: The Role of Nucleic Acids in Crown-Gall Tumor Induction . . . . . 409
U. Gloor und O. Wiss: Zur Biosynthese des Ubichinons . . . . . 410
J. M. Fine et M. Burstein: Electrophorèse sur gel d'amidon des lipoprotéines sériques humaines . . . . . 411
V. Holoubek: Changes in the Nucleic Acid Content in the Rat During Postembryonal Development . . . . . 412
H. Moussatché and A. Prouvost-Danon: Influence of Oxidative Phosphorylation Inhibitors on the Histamine Release in the Anaphylactic Reaction *in vitro* . . . . . 414
R. Miline, P. Štern et S. Huković: Sur les variations quantitatives de la sérotonine dans le cerveau . . . . . 415
F. Windisch, H. Kerner und W. Schacht: In Krebszellen induzierbare anoxygene Energiewirkung durch $O_2$-freie Dekokte aus Krebsgeschwülsten . . . . . 416
Ch. Toussaint, M. Telerman, and P. Vereerstraeten: Effects of Acute Hypochloremia on Glomerular Filtration Rate and Electrolyte Excretion in the Dog . . . . . 417
M. Hill, M. Pospíšil, and K. Dvořák: On the Participation of the Zona Glomerulosa on the Adrenal Response to Stress . . . . . 419
H. Sobel and O. Freund: The Action of Cortisone on the Embryonic Cartilage and Muscle *in vitro* . . . . . 421
M. Vojtěchovský, V. Vítek, K. Ryšánek, and H. Bultasová: Psychotogenic and Hallucinogenic Properties of Large Doses of Benactyzine . . . . . 422
A. L. Hopkins: Acceleration of Drying of Biological Material from the Frozen State by the Use of High Frequency Dielectric Heating (Pro Laboratorio) . . . . . 423
J. H. Schenkel and J. A. Kitchener: A Convenient Cell for the Determination of the Electrophoretic Velocity of Microscopic Particles (Pro Laboratorio) . . . . . 425
C. Vago et S. Chastang: Culture *in vitro* d'un tissu nymphal de lépidoptère (Pro Experimentis) . . . . . 426

*Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

Corrigendum . . . . . 427
M. A. Spirtes, Paul S. Guth, and E. H. Polley: A Central Nervous System Effect of a Non-Hallucinatory Lysergic Acid Derivative (Studiorum progressus) . . . . . 428

**E. Mettler**
**Pelikanstrasse 19**
**Zürich**

**Garantierte**
**Genauigkeit**
**Konstante**
**Empfindlichkeit**
**Bessere**
**Reproduzierbarkeit**



A 2

*Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIV / 4*

E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel
Ciba AG., Basel

Leo Pharmaceutical Products, Copenhagen
Verlag Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig
Wissenschaftliche Verlagsges. mbH., Stuttgart
Birkhäuser Verlag, Basel

Ganz Optar AG., Zürich
Firma Wild, Heerbrugg
Clichés Schwitter AG., Basel

*Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:*
*Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:*

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Italien | Belgien, Luxemburg | Dänemark | Schweden | Portugal |
| Deutschland | Holland | Norwegen | Finnland | Marokko |

---

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 44.–; other countries sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1958 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 231810; Telegrammadresse: Edita Basel*

---

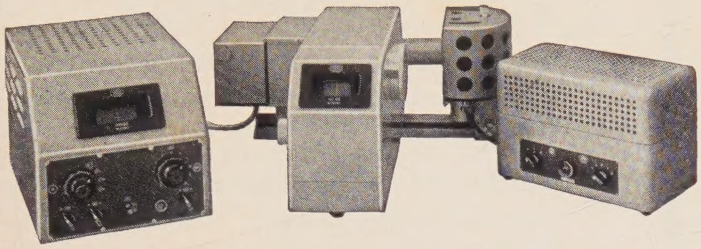
*Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel*

# ZEISS

## Das Quarz-Spektralphotometer

## PMQ II

## erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 50–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

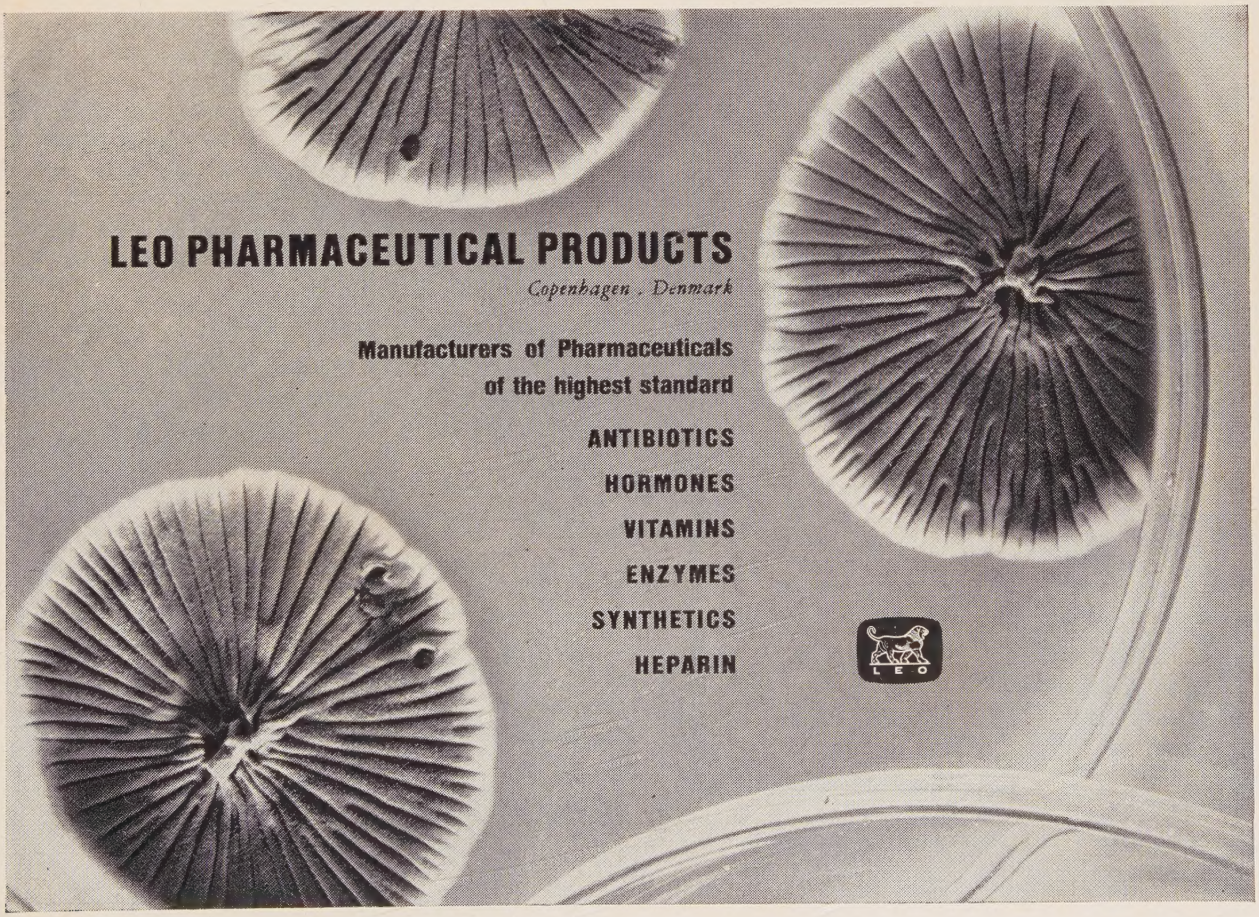
- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr).
- **Meßbereich:** 200–2500 mμ.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1P28 und PbS-Photo-Widerstand.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** mit nur 0,2 $cm^3$ Füllvolumen pro Zentimeter Schichtlänge.
- **Flammen-, Fluoreszenz-, Remissions- und Chromatogrammzusätze.**

**GANZ *Optar* AG**

**ZÜRICH**

Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 23 97 73





WILD
HEERBRUGG

# Das neue Wild M 5 Stereo-Mikroskop

Stereo-Mikroskop M 5
mit vierfachem
Vergrösserungs-
wechsler und
Durchlichtuntersatz
mit verstellbaren
Handauflagen

Für alle Gebiete der Wissenschaft und Technik.
Nach dem bekannten Wild'schen Baukasten-
prinzip konstruiert. Lässt sich mit wenigen
Handgriffen für jede Untersuchung umbauen
oder ergänzen. Verlangen Sie unverbindlich
Prospekte oder Offerten durch

**Wild Heerbrugg Aktiengesellschaft,**
**Heerbrugg**
Werke für Optik und Feinmechanik
Telephon (071) 7 24 33

NATUR-
WISSENSCHAFTLICHE
RUNDSCHAU

Schriftleitung: H. Rotta

Oktober 1958

## Sonderheft

**Berichte - Besprechungen**
**Hinweise - Nachrichten**

Nobelpreisträger Prof. Dr. F. Joliot-Curie †, Paris
*Das neue Zentrum der Grundlagenforschung für Kernphysik in Orsay/Frankreich und die Ausbildung der Forscher*

**Berichte aus der Wissenschaft**

Deutsches Museum München – Humboldt-Gedächtnis-Expedition 1958 – National Research Council of Canada – Grundlagen einer synoptisch-statistischen Theorie der Druckveränderung – Heuschreckenschwärme und Wetter – Die Arbeiten zur Erforschung der Antarktis im Internationalen Geophysikalischen Jahr – Die Relativitätsprinzipien Newtons – Selbststerilität höherer Pflanzen – Hormonale Steuerung der Fortpflanzungstätigkeit – Antimikrobielle Substanzen in Kulturpflanzen – Schicksal der Wale – Einwirkung des Lichts auf die Vermehrung der Vögel – Sojabohne als Nahrungsmittel – Industrierohstoffe – Radioaktive Markierung von Zellen – Biogenese organischer Naturverbindungen – Forschungsergebnisse über das Pfeilgift Curare – Höchste Reinheitsgrade – Moderne Chemie hilft alte Kunstschätze erhalten – Photoelektrische Diagnose des Lungenkrebses – Die Schüttellähmung – Psychiatrische Führerscheinprobleme – Second-look bei der Krebsbehandlung – Physiologie der Zirbeldrüse – Menschliche Skelettreste aus der Höhle von Shanidar/Iraq – Der Grenzhorizont nordischer Hochmoore – Junger Vulkanismus in Zentralasien – Das grosse Pantanal in Mato Grosso – Neues nordamerikanisches Industriegebiet in Louisiana

*Nachrichten und Hinweise*
Etwa 70 Kurzmeldungen aus der Wissenschaft

*Photographie und Naturwissenschaften*
Dr. H. Siering, Jena: Die Phasenkontrast-Mikrophotographie
*Wissenschaftliche Gesellschaften und Tagungen – Buchbesprechungen – Gedenktage – Hochschulnachrichten*

Monatlich ein Heft mit über 40 Seiten (DIN) A4). Bezugspreis vierteljährlich DM 7.20. Studenten 20% Nachlass. *Einzelheft DM 2.50.*

**Probeheft kostenlos!**

WISSENSCHAFTLICHE
VERLAGSGESELLSCHAFT MBH.
STUTTGART 1 – POSTFACH 40

EXPERIENTIA

Vol. XIV - Fasc. 11 Pag. 389–428 15. XI. 1958

# Ergebnisse und Probleme der organischen Anionochemie[1]

Von G. WITTIG, Heidelberg[2]

Innerhalb der stürmisch fortschreitenden Chemie beginnt sich ein Gebiet abzuzeichnen, das einmal dem Umfang und der Bedeutung nach den bislang gründlich erschlossenen gleichwertig koordiniert werden wird. Gemeint ist die organische Anionochemie[3], die einleitend definiert und gegenüber den anderen Bereichen abgegrenzt sei.

Bei Abwandlungen organischer Molekeln können betroffene Atombindungen nach dreierlei Prinzipien aufgebrochen werden, die auf Grund des Elektronenpaar-Charakters der C–*X*-Bindung vorauszusehen sind:

Die die Molekeln verändernden Vorgänge heben also mit Radikalen, Kationen oder Anionen an, die entweder frei oder latent ihre Wirksamkeit entfalten. Unter diesem Blickwinkel lässt sich die organische Chemie in drei Kapitel aufgliedern; die *organische Anionochemie* umfasst sinngemäss alle Prozesse, die auf eine negative C-Aufladung des Molekelrumpfes zurückgehen.

Welche Mittel stehen zur Verfügung, eine neutrale Molekel zu anionisieren? Grundsätzlich wird so verfahren, dass das am C haftende *X* durch einen elektropositiven Liganden ersetzt wird, der im Extremfall ein Alkalimetall-Kation ist. Handelt es sich bei *X* um Wasserstoff, der durch induktive oder elektromere Substituenteneinflüsse bereits azidifiziert ist, also eine gewisse Protonbeweglichkeit besitzt, dann lässt sich H gegen Me bei Einwirkung einer alkalimetallorganischen Verbindung gemäss:

austauschen, sofern das *R'*-Anion eine grössere Affinität zum Proton als *R* hat, also *R'*H eine schwächere Säure als *R*H ist. Der Aziditätsunterschied zwischen beiden Säuren bestimmt die Lage des sich einstellenden Gleichgewichtes. Die Geschwindigkeit der zum Gleichgewicht strebenden Hin- und Gegenreaktion wird nach neueren Untersuchungen[4] sehr stark von Einflüssen der Solvatation und Komplexbildung beherrscht und geht keineswegs symbat den Basizitäten des *R'*- und *R*-Anions, worauf noch zurückzukommen ist.

An gebräuchlichen Agenzien zur Metallierung bzw. Anionisierung seien die folgenden aufgeführt, die bei ihrer Umsetzung mit dem Substrat *R*H in die zugehörigen «Säuren» übergehen:

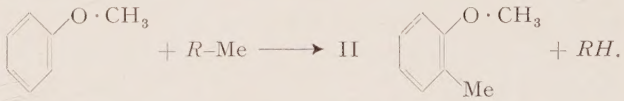
$$C_4H_9\text{–}Li > C_6H_5\text{–}Li > CH_3\text{–}Li > (C_6H_5)_3C\text{–}Na > H_2N\text{–}Na > RO\text{–}Na.$$

Entsprechend der in dieser Reihe abnehmenden Protonenaffinität der Anionen *R'* sinkt die Wirksamkeit der zugehörigen «Salze» – *cum grano salis* im ursprünglichen Wortsinn – in der gleichen Folge.

Einige Beispiele erläutern die Möglichkeiten der Metallierung. *Diphenylmethan*, das von Phenyllithium in Äther nicht angegriffen wird, liefert entsprechend dem Schema:

$$(C_6H_5)_2CH_2 + R\text{–}Me \longrightarrow I\ (C_6H_5)_2CH\text{–}Me + RH$$

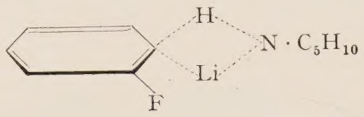
mit Butyllithium in 1,5 h 4% an dem orangefarbenen Produkt I, mit dem Komplex $[(C_6H_5)_2Li]Na$ hingegen in derselben Zeit 30%[5]. Hier zeigt sich also, dass das im Komplex wirksame Phenylnatrium auf Grund der grösseren Polarität der C-Na-Bindung dem Phenyllithium überlegen ist. Analog liegen die Verhältnisse bei der Metallierung von *Anisol*, das bei der Umsetzung mit salzfreiem Phenyllithium in 48 h 17% und mit dem Diphenyllithium-natrium-Komplex 71% an *o*-Metallanisol II bildet:



Da der protonlockernde induktive Effekt des Fluors grösser als der des Methoxyls ist, wird *Fluorbenzol* leichter als Anisol orthometalliert. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von HUIS-

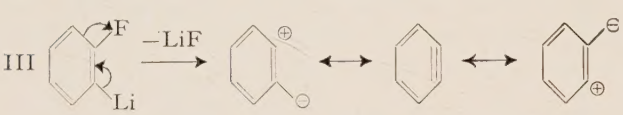
[1] Nach einem Vortrag in der Heidelberger Akademie im Juli 1958.
[2] Chemisches Institut der Universität Heidelberg.
[3] Vgl. G. WITTIG, Angew. Chem. *66*, 10 (1954).
[4] R. HUISGEN, *Neue Beiträge zur nucleophilen aromatischen Substitution*, Vortrag anlässlich der GDCh-Tagung in Frankfurt (Main) am 4. Juni 1958.
[5] G. WITTIG und E. BENZ, Chem. Ber. *91*, 874 (1958).

GEN[4], dass Lithium-piperidid sehr viel schneller als Phenyllithium Fluorbenzol metalliert, obwohl jenes aus Piperidin mit Phenyllithium hergestellt wird, obwohl also das Piperidid-Anion eine geringere Protonaffinität als das Phenyl-Anion hat. Der Autor erklärt diese Diskrepanz einleuchtend damit, dass die Orthometallierung das Übergangsstadium:

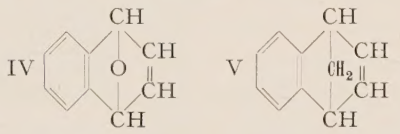



durchläuft, in dem das freie Dublett am Stickstoff entscheidend mitwirkt.

Zum Unterschied von der auch bei 100° stabilen Verbindung II spaltet III bereits bei Raumtemperatur Lithiumfluorid ab und geht in *Dehydrobenzol*[6] über:




das als kurzlebiges Intermediärprodukt unter anderem mit Dienen wie Furan und Cyclopentadien zu den Diels-Alder-Addukten IV und V abgefangen wurde:



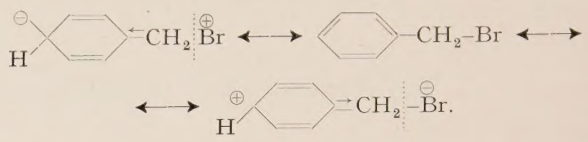

Eine weitere wichtige Methode zur Anionisierung organischer Molekeln gründet sich auf die Austauschbarkeit von Brom oder Jod gegen Metall entsprechend dem Schema:

$$R\text{–Hal} + R'\text{–Me} \rightleftarrows R\text{–Me} + R'\text{–Hal}.$$

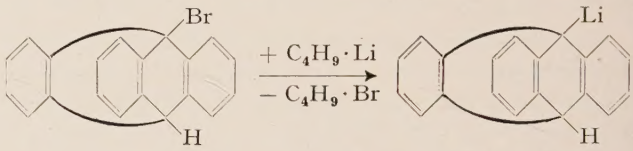
Diese Halogen-Metall-Austauschreaktionen[7], die sich kaum messbar rasch vollziehen, sind insofern überraschend, als man erwarten sollte, dass zum Beispiel bei der Umsetzung von Benzylbromid mit Phenyllithium das elektronegative Brom mit dem Lithium-Kation zu Lithiumbromid zusammentritt und gleichzeitig Diphenylmethan entsteht. Erst mit dem zunächst sich bildenden Benzyllithium reagiert das Benzylbromid in der erwarteten Weise, wobei ausschliesslich Dibenzyl anfällt:

$$C_6H_5\cdot CH_2\text{–}Br + C_6H_5\text{–}Li \longrightarrow C_6H_5\cdot CH_2\text{–}Li + C_6H_5\text{–}Br;$$
$$C_6H_5\cdot CH_2\text{–}Li + Br\text{–}CH_2\cdot C_6H_5 \longrightarrow$$
$$LiBr + C_6H_5\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot C_6H_5.$$

Die Ablösbarkeit des Broms als Kation oder Anion ist beim Benzylbromid auf die Mesomeriefähigkeit des Phenyls zurückzuführen:




Aber diese Begründung ist nicht hinreichend und erklärt insbesondere nicht den schnellen Verlauf der Austauschreaktion, die reversibel ist. Aufschlussreich ist die Feststellung, dass *1-Brom-triptycen*, dessen Brückenkopf-Halogen sich gegenüber nukleophilen Reagenzien indifferent verhält[8], bei Einwirkung von Butyllithium glatt in das Triptycyllithium umgewandelt wird[9]:




Da dem substituierenden Agens der Zugang zum bromtragenden 1-C von der Rückseite her versperrt und ausserdem die zur Brom-Abspaltung notwendige Spreitung der anderen Liganden in eine Ebene – im Gegensatz zu dem so reaktionsfreudigen Tritylbromid – unmöglich gemacht ist, muss der Brom-Lithium-Austausch räumlich auf den Bromliganden lokalisiert sein. Eine Erklärung bietet die intermediäre Bildung eines Anlagerungskomplexes VI nach:

$$R\text{–Br} + \text{Li}\text{–}R' \longrightarrow \text{VI}\left[R\text{–}\overset{\overset{\text{Li}}{|}}{\text{Br}}\text{–}R'\right] \longrightarrow R\text{–Li} + \text{Br}\text{–}R',$$

der sich nach allen Erfahrungen augenblicklich formiert. Über diese, einer Einbuchtung im Gipfel des Energiediagramms entsprechende Zwischenstufe, vollzieht sich der Platzwechsel zwischen dem kationischen Brom und Lithium. Dass dabei die Elektronenhülle des Broms zu einem Dezett aufgeweitet wird, steht im Einklang mit dem Verhalten zum Beispiel des Tetraphenyl-phosphonium-bromides, das mit dem aggressiven Anion des Phenyllithiums – ebenfalls unter Oktettausweitung – in den homöopolaren *Pentaphenylphosphor* übergeht[10]:

$$(C_6H_5)_4\overset{\oplus}{P} + \overset{\ominus}{} - C_6H_5 \longrightarrow (C_6H_5)_5P.$$

Nach den genannten Methoden der Verdrängung eines Protons oder Halogenkations durch das Metall-

[6] G. WITTIG, Angew. Chem. *69*, 245 (1957). – G. WITTIG und E. KNAUSS, Chem. Ber. *91*, 895 (1958).

[7] H. GILMAN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *61*, 106 (1939). – G. WITTIG *et al.*, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 1903 (1938); *74*, 1475 (1941).

[8] P. D. BARTLETT *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1088 (1954); *72*, 1005 (1950).

[9] G. WITTIG, Tetrahedron *3*, 91 (1958).

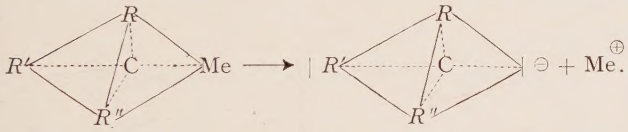
[10] G. WITTIG und M. RIEBER, Liebigs Ann. Chem. *562*, 187 (1949).

kation bilden sich die Verbindungen *R*-Me, deren Alkalimetall-Derivate eine besonders starke Polarität der C-Me-Bindung aufweisen. Während beim Tritylnatrium eine Ionendissoziation anzunehmen ist:

$$R\text{–Me} \rightleftarrows R^{\ominus} + Me^{\oplus},$$

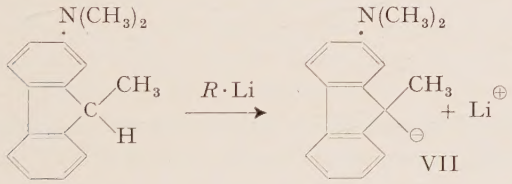
die zu Ionenassoziaten im Sinne von BJERRUM führt – die intensive Rotfärbung deutet auf das freie Tritylanion hin –, dürfte die Mehrzahl der alkalimetallorganischen Verbindungen wie das farblose Triptycyllithium oder Butyllithium völlig undissoziiert vorliegen[11]. Ihre Reaktivität verdanken diese der Wirksamkeit der zugehörigen Kryptoanionen, deren Rolle ihr Pendant in den Kryptokationen etwa der Halogenide findet.

Die Skala, die also von den Ionenbildnern bis zu den homöopolaren Metallorganika betonter Polarität reicht, wird in einer entsprechenden Reihe konfigurativer Beständigkeiten evident. Man könnte meinen, dass die Tetraederanordnung bei dissoziierenden metallorganischen Verbindungen im anionisierten Molekelrumpf erhalten bleibt, da das freiwerdende Dublett den vierten Liganden vertritt:



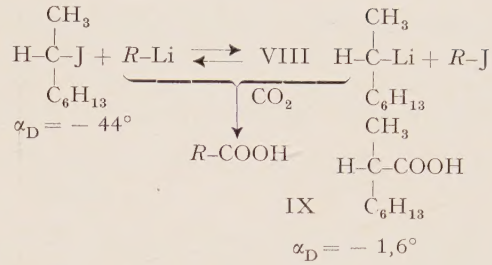
Aber das ist nicht der Fall.

Das optisch aktive *2-Dimethylamino-9-methyl-fluoren*[12] wird bei Umsetzung mit Phenyllithium sofort razemisiert:



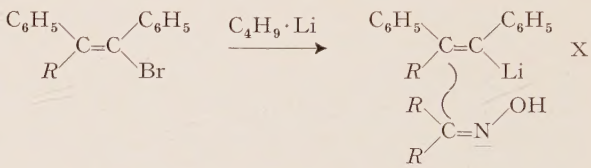
Bei der Anionisierung, die sich in der tiefen orangeroten Farbe des Metallierungsproduktes VII kundgibt, pendelt das Methyl in die spiegelbild-symmetrische Stellung.

Demgegenüber können gewisse lithiumorganische Verbindungen, in deren Molekeln das Metall homöopolar am Kohlenstoff haftet, bei tiefen Temperaturen kurzzeitig ihre Konfiguration erhalten[13]. So lieferte (–)-*Jodoctan* bei – 70° mit Butyllithium und bei nachfolgender Carboxylierung (–)-2-Methyl-octansäure, in der ungefähr 20% der Asymmetrie geblieben war:



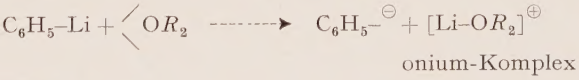
Da IX aus dem 2-Methyl-heptyllithium VIII hervorgegangen war, zeigt das Resultat, dass sowohl die Austausch- wie die Carboxylierungs-Reaktion teilweise stereoselektiv verlaufen waren und dass der metallierte Kohlenwasserstoff VIII unter den Versuchsbedingungen seine Konfiguration bewahrt hatte. Dagegen führten dieselben Umsetzungen bei 0° C zu völlig razemisierter Methyl-octansäure IX.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei ungesättigten Metallorganika, in denen das Metall an einer C=C-Gruppe haftet[14]. Die durch Brom-Lithium-Austausch gewonnenen *cis*- und *trans*-isomeren Metallierungsprodukte X gingen bei Carboxylierung und anderen metallorganischen Umsetzungen in die konfigurativ unveränderten Derivate über, zum Beispiel:



Während also das ungesättigte Carbanion X analog den Oximen mit freiem Dublett am N konfigurativ stabil ist, trifft das nicht zu bei Carbanionen etwa vom Typus VII, der mit seiner sterischen Labilität den ebenfalls konfigurativ unbeständigen Aminen an die Seite zu stellen ist:

Diese konfigurative Unbeständigkeit unterstreicht, dass das Metallkation im System *R*Me leicht abtrennbar ist und das verbleibende Carbanion mit seinem freien oder latenten Dublett in Analogie zu den Aminen als *nukleophiles Agens* wirksam wird. Das geeignete Solvens für metallorganische Verbindungen ist *Äther*, da er durch komplexe Bindung an das Metallkation die Polarität der C-Me-Gruppierung verstärkt[15]:



onium-Komplex

[11] G. WITTIG *et al.*, Liebigs Ann. Chem. *571*, 184 (1951).
[12] K. ZIEGLER und A. WENZ, Chem. Ber. *83*, 354 (1950). – G. WITTIG *et al.*, Chem. Ber. *83*, 359 (1950).
[13] R. L. LETSINGER, Angew. Chem. *70*, 151 (1958).
[14] D. Y. CURTIN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *73*, 2719, 4519 (1951); *77*, 4566 (1955).
[15] G. WITTIG, Angew. Chem. *70*, 65 (1958).

Fügt man zu einer derartigen ätherischen Lösung von Phenyllithium *Triphenylbor*, dann wird das Phenyl-Anion zum Tetraphenyloborat-Anion komplexstabilisiert, das auch in Wasser unzersetzt löslich ist:

$$C_6H_5^{\ominus} + B(C_6H_5)_3 \longrightarrow \underset{\text{at-Komplex}}{[B(C_6H_5)_4]^{\ominus}}$$

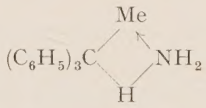
Damit wird aufgezeigt, dass es Möglichkeiten gibt, metallorganische Umsetzungen je nach Wahl des Mittels zu beschleunigen (über onium-Komplexe) oder zu verzögern (über at-Komplexe).

Die im ätherischen Medium ausserordentliche Reaktivität der alkalimetallorganischen Verbindungen kommt bei allen Typen der chemischen Abwandlung zur Geltung und wird präparativ auf breiter Basis genutzt[3].

*Substitution.* Abgesehen von der bereits behandelten Verdrängung von Protonen oder kationisiertem Halogen durch Metallionen seien hier Beispiele aufgeführt, die erkennen lassen, dass das Metallkation einer metallorganischen Verbindung bei Umsetzungen nicht immer die passive Rolle des «Zuschauers» übernimmt, sondern aktiven Anteil nehmen kann. So wird *Trityl-natrium* in flüssigem Ammoniak entgegen den Erwartungen leichter als *Trityl-kalium* aminolysiert:

$$(C_6H_5)_3C\text{–}Me + NH_3 \longrightarrow (C_6H_5)_3CH + Me\text{–}NH_2.$$

Die Ursache hierfür ist in der gegenüber dem Kaliumion stärkeren komplexbildenden Kraft des Natriumions zu suchen, die über das Zwischenstadium:




hinweg den Proton-Metallkation-Austausch erleichtert[16]. In gleicher Weise erklärt sich die Beobachtung, dass *Trityl-lithium* sofort, aber *Trityl-natrium* erst nach Stunden durch Piperidin zum Triphenylmethan entfärbt wird.

*Addition.* Dass unbeschadet der Mitwirkung des Metallkations dem Carbanion die entscheidende Rolle des nukleophilen Agenzes zufällt, wird bei den Anlagerungsprozessen deutlich. Alkalimetallorganika sind den Grignard-Verbindungen hinsichtlich ihrer Reaktionsfreudigkeit weit überlegen[17]. So laufen die Additionen namentlich lithiumorganischer Verbindungen an Carbonylderivate (Aldehyde, Ketone und Ester) generell schneller und vollständiger ab als bei Einsatz der magnesium-organischen Reagenzien:

$$R_2C{=}O \longleftrightarrow R_2\overset{\oplus}{C}\text{–}\overset{\ominus}{O} + R'\text{–Li} \longrightarrow R_2\overset{R'}{\overset{|}{C}}\text{–}\overset{\ominus}{O} + Li^{\oplus}.$$

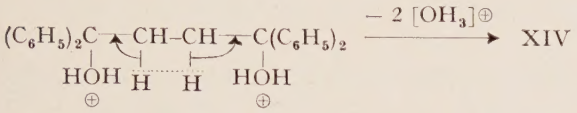
Darüber hinausgehend sind Additionen an C=C-Gruppen möglich, die mit Grignard-Verbindungen versagen. Als Beispiel unter vielen sei die Vereinigung von *Phenyl-isopropyl-kalium* mit *Stilben* zum Addukt XI genannt[18]:

$$C_6H_5\cdot CH{=}CH\cdot C_6H_5 + C_6H_5\cdot C(CH_3)_2K \dashrightarrow$$

XI $\quad C_6H_5\cdot CH\text{–}CH\cdot C_6H_5$
$\quad\quad\quad

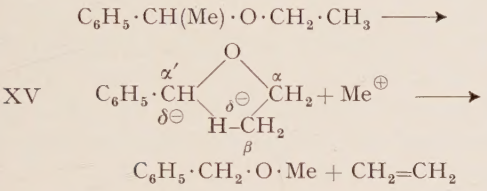
Hydrid-Ionen (am 2- und 3-C), die vom Akzeptor zum Triphenyloboranat-Komplex aufgenommen werden. Das treibende Moment ist die Bildung des energiearmen Konjugationssystems XIV.

Dieser Vorgang ist invers der Erzeugung desselben Kohlenwasserstoffes XIV aus *Tetraphenyl-butandiol* unter der Einwirkung von Säure:



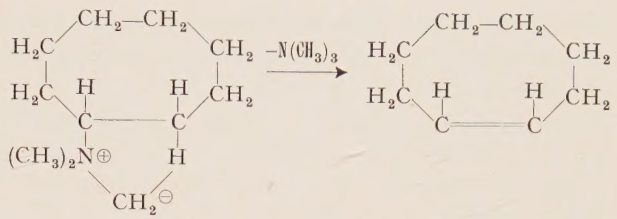

Hier werden die Kohlenstoffatome 1 und 4 unter Eliminierung von Wasser elektropositiv aufgeladen, was zu einer Abstossung von Protonen am 2- und 3-C führt. Eine Kohärenz der hier in Stufen beschriebenen säure-katalysierten Dehydratisierung ist wahrscheinlich[24].

Ebenfalls eine Eliminierungsreaktion ist der Zerfall von *metalliertem Benzyl-äthyläther* zu Lithium-benzylat und Äthylen[26]:



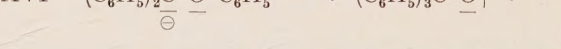

Hier liess sich der Reaktionsverlauf am deuterierten Benzyläthyl-äther klarstellen. Die zunächst erfolgende $\alpha'$-Anionisierung führt zu einer Abwanderung eines $\beta$-ständigen Protons zum $\alpha'$-C über eine Wasserstoffbrücke gemäss XV. Die Tendenz also zur *Ladungsverteilung* erleichtert die $\beta$-Eliminierung, die mit abnehmender $\alpha'$-Protonenbeweglichkeit erschwert wird, wie das bei metallorganischer Zersetzung von *Diäthyläther* zu Äthanolat und Äthylen der Fall ist[27].

Dieses Prinzip der $\alpha',\beta$-Eliminierung wurde auch beim Hofmann-Abbau erkannt, sofern man quartäre Ammoniumsalze mit Metallorganika umsetzt[28]. Ein eindeutiger Beweis dafür ist der Reaktionsverlauf beim *Cyclooctyl-brommethyl-dimethyl-ammoniumbromid*, das über das primär entstehende N-Ylid ausschliesslich *cis*-Cycloocten liefert:




*Cyclooctyl-trimethyl-ammonium-bromid* bildet mit Phenyllithium ebenfalls *cis*-Cycloocten, dagegen mit Kaliumamid in flüssigem Ammoniak ausschliesslich das *trans*-Isomere und schliesslich bei der thermischen Zersetzung der quartären Base eine Mischung der *cis*- und *trans*-Formen; ein Hinweis, dass beim normalen Hofmann-Abbau beide Prozesse der $\beta$- und $\alpha',\beta$-Eliminierung nebeneinander einhergehen.

*Isomerisation.* Anders verhalten sich metallierte Äther, deren Konstitution eine Eliminierung ausschliesst. So lagert sich der anionisierte *Benzhydryl-phenyläther* zum Triphenylcarbinolat um[29]:




Da die Isomerisation vollständig abläuft und da fernerhin XVI in tiefroter Lösung eine ausgeprägte Absorptionsbande besitzt, konnte der Vorgang reaktionskinetisch auf kolorimetrischer Basis untersucht werden. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes unter den angewandten Bedingungen kleiner Konzentrationen zeigt, dass der metallierte Äther völlig dissoziiert ist. Wie fernerhin aus der linearen Abhängigkeit

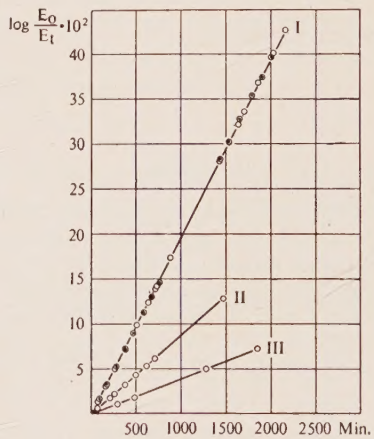



Abb. 1. Lithium-benzhydryl-phenyläther in Glykol-dimethyläther. Isomerisation bei 40,6° C (I), 34,6° C (II) und 28,6° C (III)

° 1. Messung; • 2. Messung

der log $E_0/E_t$-Werte von der Zeit (Abb. 1 und 2) zu entnehmen ist, sind für die Isomerisationen in Glykoldimethyläther und Tetrahydrofuran bei allen drei Temperaturen die Bedingungen der Monomolekulari-

[24] Sehr viel leichter erfolgen Eliminierungen bei Olefinen wie etwa dem *ω-Brom-styrol*, das unter der Einwirkung von lithiumorganischen Verbindungen in Phenyl-acetylen übergeht:

$$R\cdot CH{=}CH\cdot X + R\mathrm{Li} \rightarrow R\cdot C{\equiv}CH + RH + \mathrm{Li}X;$$

vgl. [25].

[25] G. WITTIG *et al.*, Ber. dtsch. chem. Ges. *74*, 1481 (1941); *77*, 306 (1944).

[26] G. WITTIG und L. LÖHMANN, Liebigs Ann. Chem. *550*, 266 (1942). – A. LÜTTRINGHAUS *et al.*, Liebigs Ann. Chem. *557*, 59 (1947). – R. L. LETSINGER, Angew. Chem. *70*, 154 (1958).

[27] K. ZIEGLER und N. G. GELLERT, Liebigs Ann. Chem. *567*, 185 (1950).

[28] G. WITTIG *et al.*, III. Mitt. Liebigs Ann. Chem. *612*, 102 (1958). – F. WEYGAND *et al.*, Chem. Ber. *91*, 1691 (1958).

[29] G. WITTIG *et al.*, VII. Mitt. Suomen Kemistilehti [B] *31*, 2 (1958); VI. Mitt. Liebigs Ann. Chem. *605*, 69 (1957).

tät streng erfüllt. Aus der Temperaturfunktion der Geschwindigkeitskonstanten wurde eine Aktivierungsenergie von rund 25 kcal errechnet.

Aus diesen Messungen, die in Übereinstimmung mit chemischen Befunden stehen, folgt, dass die Phenylgruppe innerhalb des Kraftfeldes des Anions vom O zum C wandert.

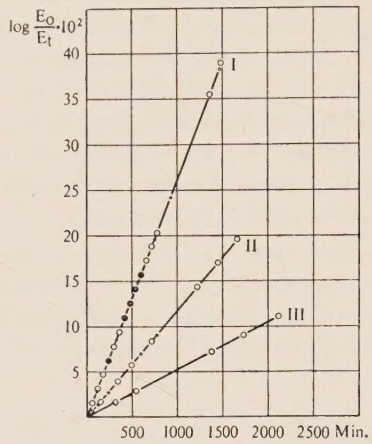
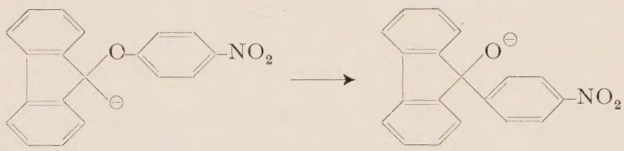


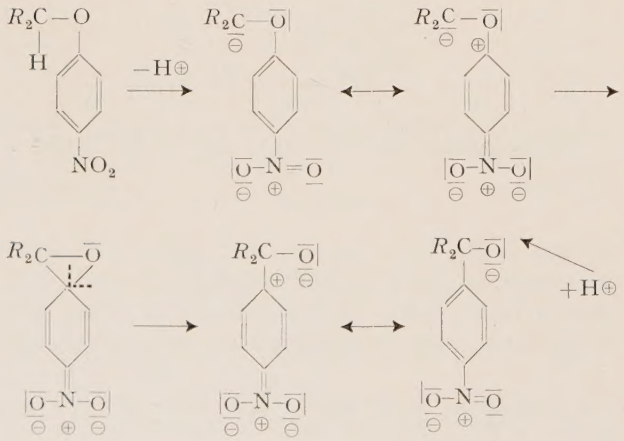

Abb. 2. Lithium-benzhydryl-phenyläther in Tetrahydrofuran. Isomerisation bei 40,6° C (I), 34,6° C (II) und 28,6° C (III)

° 1. Messung • 2. Messung

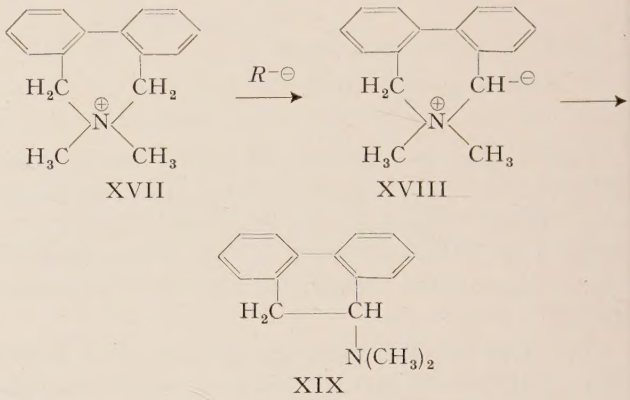
Hiermit im Einklang steht auch das Verhalten anionisierter Äther mit substituierter Phenylgruppe. So lässt sich *Fluorenyl*-p-*nitro-phenyläther* besonders leicht in alkalischem Milieu zum 9-Nitro-phenyl-fluorenol umlagern[29]:




Dieses Resultat ist verständlich, da die Nitrogruppe auf Grund ihres + *E*-Effektes das paraständige Kohlenstoffatom positiviert und entsprechend dem folgenden Schema die Fixierung des sich verschiebenden Nitrophenyls am Carbanion herausfordert:

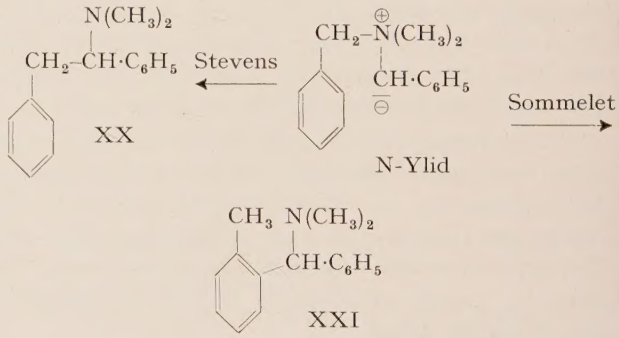



Intraanionische Isomerisationen sind nicht auf Ätherderivate beschränkt. Auch geeignete quartäre Ammoniumsalze verändern ihr Atomgerüst bei Einwirkung lithiumorganischer Verbindungen. Eingehend untersucht ist die *Stevens-Umlagerung*[30], die auch präparative Bedeutung gewonnen hat. So lassen sich *Phenanthren* und Derivate wie folgt synthetisieren:




Das zyklische Ammoniumsalz XVII bildet unter Einwirkung lithiumorganischer Reagenzien das N-Ylid XVIII, dessen kationisch gelockerte «Benzylgruppe» sich vom Stickstoff zum Kohlenstoff unter Bildung von XIX bewegt. Sein Jodmethylat lässt sich unter den Bedingungen des Hofmann-Abbaus leicht in das Phenanthren überführen.

Das XVII verwandte *Dimethyl-dibenzyl-ammoniumbromid* lagert sich bei seiner Metallierung entsprechend zum Dimethylamino-dibenzyl XX um. Nebenher aber erfolgt hier ein zweiter Entladungsprozess, der zum isomeren Dimethylamino-benzyl-toluol XXI führt:




Dieser von uns als Sommelet-Umlagerung bezeichnete Vorgang wurde wie die Stevens-Isomerisation von WITTIG *et al.*[31] im Sinne von Ylid-Isomerisationen geklärt und ihr Chemismus an mehreren Beispielen eindeutig bewiesen[32].

[30] G. WITTIG, Angew. Chem. *63*, 15 (1951); Exper. *12*, 41 (1956).
[31] G. WITTIG *et al.*, Liebigs Ann. Chem. *560*, 116 (1948). – Vgl. J. F. BUNNETT, Quart. Rev. *12*, 15 (1958).
[32] Vgl. G. WITTIG, Angew. Chem. *68*, 505 (1956). Das erste P-Ylid dürfte von H. STAUDINGER und J. MEYER [Helv. chim. Acta *2*, 619, 635 (1919)] hergestellt sein. Später, 1936, hat F. KRÖHNKE [vgl. Angew. Chem. *65*, 605 (1953); Chem. Ber. *91*, 1295 (1958)] in origi-

Hier wie bei allen intraanionischen Umlagerungen hat sich herausgestellt, dass sich die wandernden Liganden in die folgende Reihe abnehmender Beweglichkeit einordnen:

$$p\text{-}O_2N\cdot C_6H_4- > \quad C_6H_5- \quad > p\text{-}CH_3\cdot C_6H_4- > \\ p\text{-}CH_3\cdot O\cdot C_6H_4-.$$

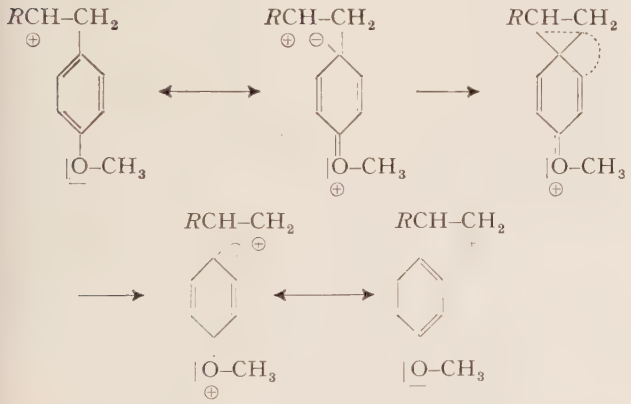
Danach wechselt die *p*-Nitrophenyl-Gruppe bevorzugt ihren Platz, während sich der Anisyl-Rest nicht vom Haftatom trennt.

Demgegenüber nimmt die Beweglichkeit der abwandernden Liganden bei Isomerisationen, die sich am Kation vollziehen, in umgekehrter Folge ab. Dies gilt unabhängig davon, ob diese Reste

vom C zum C (Pinakolin- und Retropinakolin-Umlagerung),
vom C zum N (Beckmann- und Stieglitz-Umlagerung) oder
vom C zum O (Criegee-Umlagerung)

verlagert werden[33].

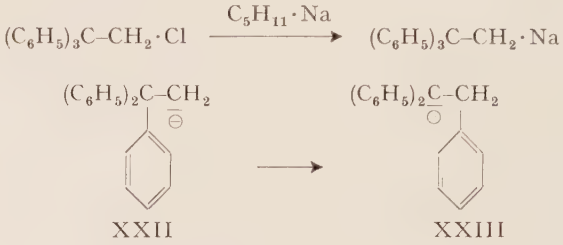
Die bei intrakationischen Isomerisationen hervortretende Beweglichkeit der Anisylgruppe wird kommentarlos durch das folgende Schema verständlich:




nellen Untersuchungen die von ihm als Pyridinium-betaine bezeichnete Verbindungsklasse entdeckt, die letzten Endes *resonanzstabilisierte* N-Ylide sind. Um 1941 haben G. WITTIG und M. H. WETTERLING [siehe Liebigs Ann. Chem. *555*, 133 (1944)] bei Versuchen, durch Umsetzung von Tetramethyl-ammonium-halogenid mit Phenyllithium das Phenyltetramethyl-ammonium zu synthetisieren, die Muttersubstanz der N-Ylide, das farblose Trimethyl-ammoniummethylid, nachgewiesen, das nach neueren Arbeiten [G. WITTIG und R. POLSTER, Liebigs Ann. Chem. *599*, 5 (1956)] als Komplex $[(CH_3)_3\overset{\oplus}{N}\text{–}CH_2\overset{\ominus}{}\text{–}Li\text{–}Hal]$ formuliert wird.

[33] Literatur siehe G. WITTIG und R. CLAUSNIZER, Liebigs Ann. Chem. *588*, 145 (1954).

Auf dem Gebiet der *intraanionischen* Isomerisationen, bei denen also bewegliche Liganden vom O zum C (Ätherisomerisation) und vom N zum C (Stevens- und Sommelet-Isomerisation) abwandern, fehlte noch die dritte Variante, nämlich die Ligandenverschiebung vom C zum C. Diese Lücke ist neuerdings ausgefüllt worden[34]. Es wurde beobachtet, dass *Triphenyl-äthyl-chlorid* bei Einwirkung von Amylnatrium oder Natriumamid über das Anion XXII zum Isomeren XXIII umgewandelt wird, das je nach den angewandten Bedingungen in 1,1,2-Triphenyl-äthylen und andere Derivate überging:




Es bleibt abzuwarten, ob auch bei dieser intraanionischen Umlagerung die oben gebrachte Reihe der Ligandenbeweglichkeit bestätigt wird.

---

Rückblickend ergibt sich, dass eine negative Aufladung am Kohlenstoff den anionisierten Molekelrumpf zu allen Reaktionstypen bereit macht, die umgekehrt auch bei positiver C-Aufladung bekannt sind. Wie bei ihrer Kationisierung erschliesst auch die im anionisierten Zustand aktive Molekel eine Fülle von präparativen Möglichkeiten, von denen manche realisiert, aber viele noch nicht ausgeschöpft sind.

*Summary*

In the alkali-metal organic compounds $R\text{–}\overset{\delta\ominus}{M}\overset{\delta\oplus}{e}$, the organic part of the molecule, which is negatively charged, displays, as anion or as cryptoanion, a specific activity which becomes evident in the metallation ('anionisation') of organic molecules, and in the processes of substitution, addition, elimination, and isomerisation. The present-day state of opinions is described by characteristic examples.

[34] E. GROVENSTEIN, JR., J. Amer. chem. Soc. *79*, 4985 (1957). – H. E. ZIMMERMANN und F. J. SMENTOWSKI, J. Amer. chem. Soc. *79*, 5455 (1957).

# Brèves communications - Kurze Mitteilungen
# Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

## Über die Kristallstruktur des Zeolithes Chabasit[1]

In der Struktur des Chabasites, wie sie von Wyart[2] gefunden worden war, treten mehrere unwahrscheinliche (Si, Al)-O-Abstände (1,46, 2,07 Å) auf, so dass es angezeigt erschien, diese Struktur neu zu bestimmen. Kington und Laing[3] versuchten zwar, die Sorptionseigenschaften des Chabasites gegenüber Argon und Methan ($\Phi = 3{,}84$, 4,25 Å, schnelle Sorption durch dehydrierten Chabasit), Propan (4,9 Å) und *n*-Butan (langsame Sorption) bzw. *iso*-Butan (5,6 Å, keine Sorption) mittels der Struktur von Wyart, welche Kanäle von nur etwa 3 Å aufweist, zu erklären; doch ist die Argumentation wenig stichhaltig.

Die Chabasitstruktur wurde neu an analysiertem Material von Schattig Wichel (Schweiz) (vgl. Niggli, Koenigsberger und Parker[4]) bestimmt. Die angegebene Formel lautet:

$$(Na_2, K_2)_{0,1}\, Ca_{3,3}\, (Si_{16,6}Al_{7,4}\, O_{48}) \cdot 0{,}5\ Na(OH) \cdot 23{,}35\ H_2O.$$

Es wurden Pulver-, Dreh- und Weissenbergaufnahmen hergestellt, welche die Gitterkonstanten $a_{rho.} = 9{,}35$ Å, $\alpha = 94°\,37'$, (bzw. $a_{hex.} = 13{,}74 \pm 0{,}03$ Å, $c_{hex.} = 14{,}83 \pm 0{,}03$ Å, $c/a = 1{,}079$) und die Raumgruppe $D_{3d}^5$-$R\bar{3}m$ ergaben. In der rhomboedrischen Zelle ist eine halbe obige Einheit enthalten. Ein ($N(z)$-$z$)-Test und das Wilson-Verhältnis $\varrho = (U)^2/U^2 = 0{,}59$ bestätigen die Anwesenheit eines Symmetriezentrums. Als Temperaturfaktor wurde $B = 2{,}50$ Å$^2$ gefunden. Verschiedene zeitraubende Versuche, die Struktur von Wyart mittels zwei- und dreidimensionaler Methoden zu verbessern, misslangen. Die *direkte* Bestimmung der Vorzeichen der $F$-Werte nach der Methode der Ungleichungen und der Statistik ergab etwa 240 Werte. Mit diesen wurde eine dreidimensionale Fouriersynthese berechnet, welche für die neue Struktur folgende vorläufige Parameter der (Si, Al)-Atome lieferte: $x = 0{,}10_4$, $y = 0{,}33_3$, $z = -\,0{,}12_8$, mit einem Abstand Si–Si = 3,13 Å (im Faujasit 3,09[5]). Das (Si, Al)-Gerüst weist zweierlei Arten von Käfigen auf: hexagonale Prismen und ein grosses Polyeder, das von zwei Sechsecken, von 6 + 6 Quadraten und von 6 Achtecken begrenzt ist. Dieses grosse Polyeder grenzt mit den 6 Achtecken an 6 umgebende gleiche Polyeder. Auf diese Weise ist ein Diffundieren in den verschiedensten Richtungen durch die Achtecke von etwa 4,0 Å Durchmesser möglich. Über die Beziehungen zu der Struktur von Gmelinit und Lévyn vgl. [5–7].

[1] Mitteilung Nr. 102, Abteilung für Kristallographie und Strukturlehre, Universität Bern.

[2] J. Wyart, Bull. Soc. franç. Min. *56*, 81 (1933).

[3] G. L. Kington and W. Laing, Trans. Faraday Soc. *51*, 287 (1955).

[4] P. Niggli, J. Koenigsberger und R. L. Parker, *Die Mineralien der Schweizer Alpen*, Bd. 2 (Wepf, Basel 1940), S. 549, Analyse 5.

[5] G. Bergerhoff, H. Koyama und W. Nowacki, Exper. *12*, 418 (1956).

[6] L. S. Dent und J. V. Smith, Nature *181*, 1794 (1958).

[7] W. Nowacki, M. Aellen und H. Koyama, Schweiz. min. petr. Mitt. *38*, 53 (1958).

Ganz unabhängig von uns haben auch Dent und Smith[6] die Struktur von Chabasit neu bestimmt und sind zum selben Resultat gelangt.

Unser bester Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. L. Parker (Zürich) für die Substanzprobe, dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für Unterstützung und Herrn Dr. G. Bergerhoff (jetzt Bonn) für Mithilfe bei der Herstellung von Röntgenaufnahmen.

W. Nowacki, H. Koyama und M. H. Mladeck

*Mineralogisch-petrographisches Institut der Universität Bern, 29. August 1958.*

*Summary*

The crystal structure of chabazite was investigated by means of X-rays. A new (Si, Al)-lattice was found [different from that of Wyart (1933)] in the space group $D_{3d}^5$-$R\bar{3}m$: (Si, Al) = (12 *i*) = $x\,y\,z$ with $x = 0{,}10_4$, $y = 0{,}33_3$, $z = -\,0{,}12_8$. The lattice forms two kinds of cages: hexagonal prisms and big holes, which explain the sorptive properties of this zeolite.

---

## Recalcification *in vitro* de l'os compact décalcifié

Afin de mieux comprendre la distribution *in vivo* du $Ca^{45}$ dans l'os compact[1], il est intéressant de définir l'affinité *in vitro* de ce tissu pour le calcium. L'affinité de l'os non décalcifié est bien connue[2]. Celle de l'os décalcifié reste à préciser.

Des coupes transversales de diaphyses de chiens adultes sont réduites par usure sous alcool à une épaisseur d'environ 50 μ et sont microradiographiées (Fig. 1). Elles sont aussitôt traitées au Na-EDTA à pH 7 pendant 24 h. La décalcification efface l'image microradiographique caractéristique et rend négative la réaction de von Kossa.

Les coupes ainsi décalcifiées séjournent ensuite, suspendues par un fil de lin, pendant 20 h à 37°C dans une solution préparée d'après Cartier et Picard[3]. Au milieu de Robison (NaCl: 9 g; $NaHCO_3$: 0,3 g; KCl: 0,4 g; $MgSO_4$: 0,25 g; eau: pour faire 1,000 cm$^3$) tamponné à pH 8–8,5 (véronal sodique-acide chlorhydrique 0,1 *M*), on ajoute du chlorure de calcium et de l'ATP (Sigma Grade) dans un rapport Ca/P de 2/1 et à une concentration de 800 mg de Ca/l.

Le résultat est illustré par la microradiographie de la Figure 2. Les ostéones qui étaient les moins calcifiés au départ (ostéones *a* de la Figure 1) se sont chargés *in vitro* de plus de calcium que le reste du tissu. Les logettes des

[1] R. Ponlot, Arch. Biol. *69* (1958) (Sous presse).

[2] R. Amprino, Z. Zellforsch. *37*, 240 (1952). – P. Lacroix, Exper. *8*, 426 (1952).

[3] P. Cartier et J. Picard, Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) *37*, 485 (1955).

ostéocytes et les canaux de Havers sont le siège d'une précipitation localisée, ce qui gêne un peu la lecture de l'image.

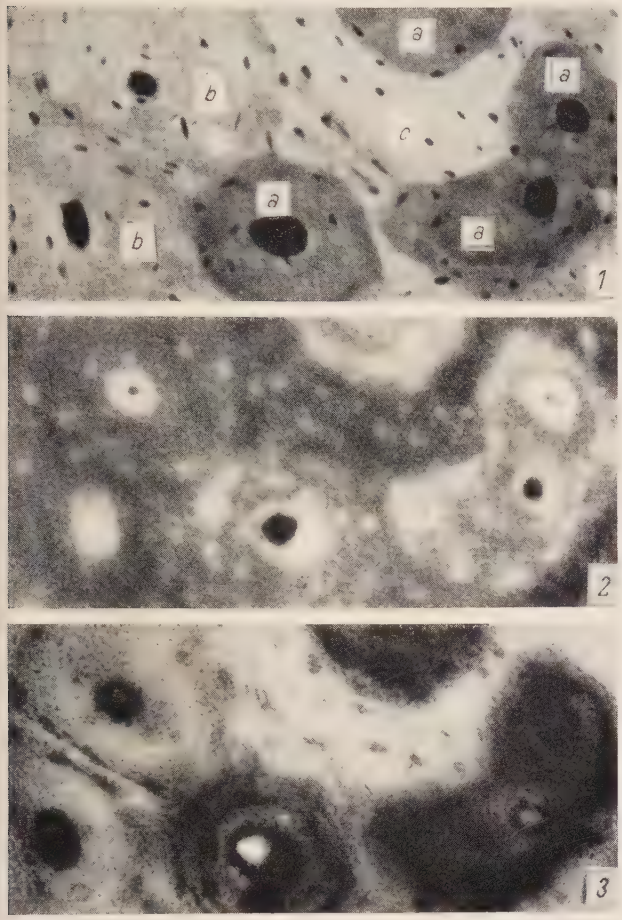



Fig. 1. Microradiographie d'une coupe transversale de la diaphyse humérale d'un chien adulte. Le champ comporte quatre ostéones (marqués *a*) qui ont fini de déposer leurs lamelles, mais dont la calcification est incomplète, et deux ostéones (marqués *b*) dont la calcification est achevée ou presque achevée. En *c*, s'observe un fragment du système des lamelles fondamentales. (× 211.)

Fig. 2. Microradiographie correspondant à la précédente. La coupe a été décalcifiée puis recalcifiée *in vitro* suivant le procédé décrit dans le texte. La recalcification se décèle essentiellement dans les ostéones (marqués *a* dans la Figure 1) dont la calcification était incomplète. (× 211.)

Fig. 3. La méthode de von Kossa souligne la répartition histologique de la recalcification démontrée par la Figure 2. (× 211.)

Nous avons cherché à mieux mettre en évidence l'enseignement de la microradiographie. La méthode de von Kossa (Fig. 3) est très utile car elle révèle, ça et là, des nuances mal discernables aux rayons X (voir, par exemple, dans la Figure 2 et dans la Figure 3, les régions répondant aux éléments *b* et *c* de la Figure 1).

Bien qu'on l'ait nié, nous montrons donc qu'il est possible de recalcifier *in vitro* de l'os compact décalcifié. Le succès dépend de nombreux facteurs. L'ATP ne peut être remplacé ni par un orthophosphate, ni par un glycérophosphate, ni par un pyrophosphate. Le mode de décalcification a son importance: après l'acide nitrique, par exemple, la recalcification ultérieure n'est plus obtenue. Enfin le matériel doit être frais ou avoir été conservé à la congélation.

Le phénomène que nous venons de décrire peut aussi être constaté par la méthode autoradiographique: il suffit d'ajouter une trace de $Ca^{45}Cl_2$ à la solution dont la composition a été donnée ci-dessus.

Notre expérience comporte une signification qui lui est propre: elle prouve que la portion organique de l'os compact n'est pas homogène en ce qui concerne son affinité pour le calcium: seuls fixent le calcium de façon notable les ostéones qui, *in vivo*, étaient incomplètement calcifiés (et dont on connaît par ailleurs les affinités tinctoriales particulières[4]). La calcification de ces ostéones semble donc déterminée par une configuration critique des fibrilles collagènes et des mucopolysaccharides de la substance fondamentale. C'est précisément l'hypothèse que des expériences portant non pas sur l'os, mais sur le cartilage préosseux, ont suggérée à Sobel[5].

Le rôle joué par l'ATP dans notre recalcification artificielle, son éventuel intérêt dans l'étude de la calcification normale, sont des questions de biochimie échappant à la compétence de notre groupe, qui entend s'en tenir à l'aspect morphologique du sujet.

Sous cet angle, la recalcification *in vitro* semble se prêter à certains développements. Nous songeons aux différences de teneur en calcium d'une lamelle à la suivante au sein d'un même ostéone et à leurs rapports avec la constitution fibrillaire[6]. Nous songeons surtout aux nouvelles possibilités qui s'ouvrent dans les recherches sur les relations collagène-cristaux: suivie au microscope électronique, la recalcification serait peut-être aussi instructive que l'a été la décalcification, étudiée par Robinson et Watson[7].

P. Lacroix, R. Ponlot et A. Dhem

*Institut d'Anatomie, Université de Louvain (Belgique) et Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires, le 7 juillet 1958.*

*Summary*

We report the possibility of recalcifying decalcified sections of adult compact bone. Recalcification occurs mainly in those osteons which had a low calcium content *in vivo*.

[4] J. Vincent, *Recherches sur la constitution de l'os adulte*, Thèse Université Louvain, Ed. Arscia (Bruxelles 1955).

[5] A. E. Sobel, Ann. N. Y. Acad. Sci. *60*, 713 (1955).

[6] J. Vincent, Exp. Cell Res. *12*, 422 (1957).

[7] R. A. Robinson et M. L. Watson, Ann. N. Y. Acad. Sci. *60*, 596 (1955).

## Konstitutionsaufklärung und Synthese von Psilocybin

Vor einigen Monaten gelang es, das psychotrop wirksame Prinzip aus dem mexikanischen Rauschpilz *Psilocybe mexicana* Heim in kristallisierter Form zu isolieren[1,2]. Der neue Wirkstoff, der Psilocybin genannt wurde, konnte seither auch noch in andern mexikanischen Psilocybe-Arten, nämlich in *P. caerulescens* Murr. var. *Mazatecorum* Heim, *P. semperviva* Heim et Cailleux, *P. Zapotecorum* Heim und *P. Aztecorum* Heim und in *Stropharia cubensis* Earle aufgefunden werden[3]. Aus dem

[1] A. Hofmann, R. Heim, A. Brack und H. Kobel, Exper. *14*, 107 (1958).

[2] R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Hofmann und R. Cailleux, C.R. Acad. Sci. *246*, 1346 (1958).

[3] R. Heim und A. Hofmann, C. R. Acad. Sci. *247*, 557 (1958).

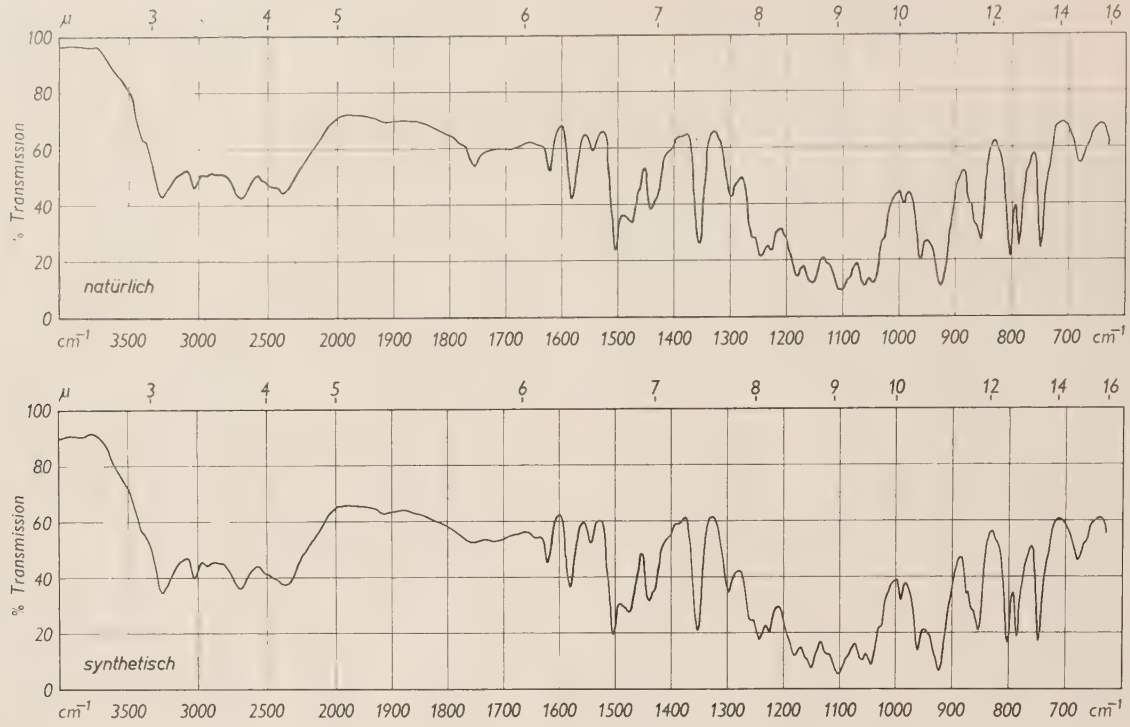



Abb. 1. IR.-Spektrum von natürlichem und synthetischem Psilocybin in KBr.

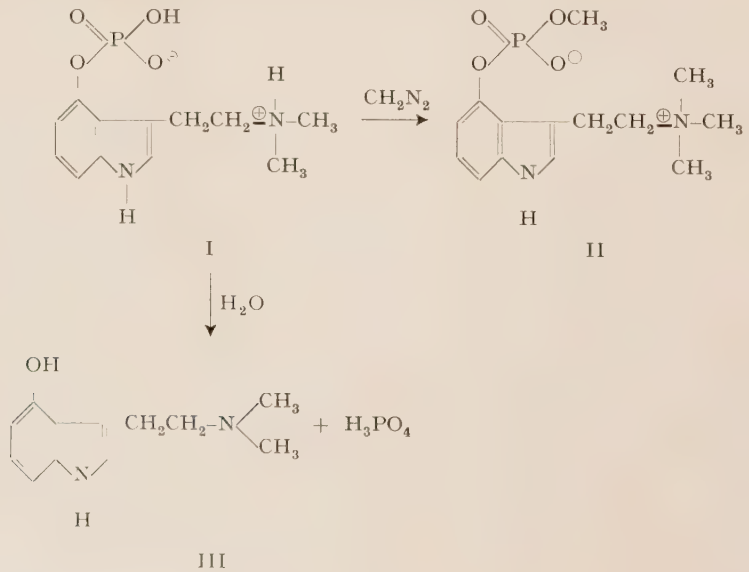
in künstlicher Kultur verhältnismässig leicht zugänglichen sklerotienhaltigen Mycel[2] liess sich dann eine grössere Menge Psilocybin gewinnen, die für die Konstitutionsaufklärung ausreichte. Nachstehend geben wir das Resultat dieser Untersuchungen in Form einer vorläufigen Mitteilung bekannt.

Die Abbauversuche und weitere Elementaranalysen ergaben für Psilocybin die Bruttoformel $C_{12}H_{17}O_4N_2P$. (Berechnet C 50,7%, H 6,0%, N 9,9%, P 10,9%; gefunden C 50,9%, H 6,2%, N 9,8%, P 10,9%.) Psilocybin ist schwer analysierbar. Bei den ersten Elementaranalysen bereiteten die Phosphorbestimmungen Schwierigkeiten und führten zu einer provisorischen Bruttoformel $C_{13}H_{18(20)}O_3N_2P_2$, die sich als unrichtig erwies. Die richtige Bruttoformel konnte erst anhand der nachstehend beschriebenen Abbauergebnisse endgültig festgelegt werden.

Bei der Methylierung des Psilocybins mit Diazomethan treten zwei Methylgruppen in das Molekül ein, und es entsteht eine neutral reagierende Verbindung (II) $C_{14}H_{21}O_4N_2P$ (berechnet C 53,8%, H 6,8%, N 9,0%, P 9,9%; gefunden C 53,4%, H 7,0%, N 9,1%, P 10,4%). Beim Erhitzen von II wird Trimethylamin abgespalten, das in Form seines Pikrates identifiziert wurde.

Psilocybin zerfällt bei der Hydrolyse in 4-Hydroxydimethyltryptamin (III), $C_{12}H_{16}ON_2$ (berechnet C 70,6%, H 7,9%, O 7,8%, N 13,7%; gefunden C 70,5%, H 7,6%, O 7,9%, N 13,4%), und ein Äquivalent Phosphorsäure, die als Ammonium-Magnesium-Salz bestimmt wurde.

Aus diesen im nachstehenden Formelschema dargestellten Umsetzungen ergibt sich für Psilocybin die Konstitution I.



Die Strukturformel I konnte durch Totalsynthese gesichert werden. Ausgehend von 4-Benzyloxy-indol[4] wurde nach der Oxalylchlorid-Methode[5] 4-Hydroxy-dimethyltryptamin (III) aufgebaut, das mit dem phosphorfreien Hydrolysenprodukt des Psilocybins identisch war. Veresterung der phenolischen Hydroxylgruppe in III mit Dibenzylphosphorylchlorid und anschliessende reduktive Debenzylierung führte zu I, $C_{12}H_{17}O_4N_2P$ (berechnet C 50,7%, H 6,0%, N 9,9%, P 10,9%; gefunden C 50,3%, H 5,9%, N 9,7%, P 10,5%). IR.-Spektrum (vgl. Abb. 1) und alle übrigen Eigenschaften stimmten mit denen des natürlichen Psilocybins überein.

Psilocybin ist die erste in der Natur aufgefundene phosphorylierte Indol-Verbindung. Ferner liegt hier das erste natürlich vorkommende Tryptamin-Derivat vor, das in der 4-Stellung des Indol-Systems mit einer Hydroxylgruppe substituiert ist.

Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium Sandoz (Dr. W. Schöniger) ausgeführt, die Spektren in der spektralanalytischen Abteilung (Dr. H. G. Leemann) aufgenommen.

A. Hofmann, A. Frey,
H. Ott, Th. Petrzilka
und F. Troxler

*Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium Sandoz A.G., Basel, 16. September 1958.*

*Summary*

The structure of Psilocybin, the psychotropic active principle of the Mexican mushroom *Psilocybe mexicana* Heim, has been elucidated. Psilocybin is the phosphoric acid ester of 4-hydroxy-dimethyltryptamine. This structure was confirmed by total synthesis.

[4] A. Stoll, F. Troxler, J. Peyer und A. Hofmann, Helv. chim. Acta *38*, 1452 (1955).

[5] M. E. Speeter und W. C. Anthony, J. Amer. chem. Soc. *76*, 6209 (1954).

## Cinétique de l'inhibition de l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique par certains complexants*

L'activité catalytique des ions métalliques est fortement influencée par l'addition au milieu de complexants. Souvent on assiste à une inhibition, parfois à une activation et les deux effets peuvent avoir lieu alternativement selon la composition du milieu[1]. L'activité catalytique des ions $Cu^{++}$ dans l'oxydation de l'acide ascorbique est le plus souvent diminuée ou complètement éliminée en présence de complexant[2,3].

On admet que le $Cu^{++}$ forme un complexe avec l'acide ascorbique ($AH_2$). Ce complexe dissocie après le passage d'un électron de la vitamine sur le métal: $AH^- + Cu^{++} \rightleftarrows [AH^-Cu^{++}] \rightleftarrows [AHCu]^+ \rightarrow AH + Cu^+$. Le $Cu^+$ serait ensuite reoxydé en $Cu^{++}$ et le radical libre AH réagirait avec l'oxygène. Ainsi en présence d'un excès d'$AH_2$ les ions $Cu^{++}$ formeraient pratiquement pendant toute la durée de la réaction un complexe avec l'$AH_2$. L'inhibition des complexants ajouté au mélange $AH_2 + Cu^{++}$ peut donc s'exercer selon 2 mécanismes différents: a) entrer en compétition avec l'$AH_2$ et capter les ions $Cu^+$ ou $Cu^{++}$, ou b) réagir avec le complexe $[AH^-Cu^{++}]$ d'une façon non-compétitive.

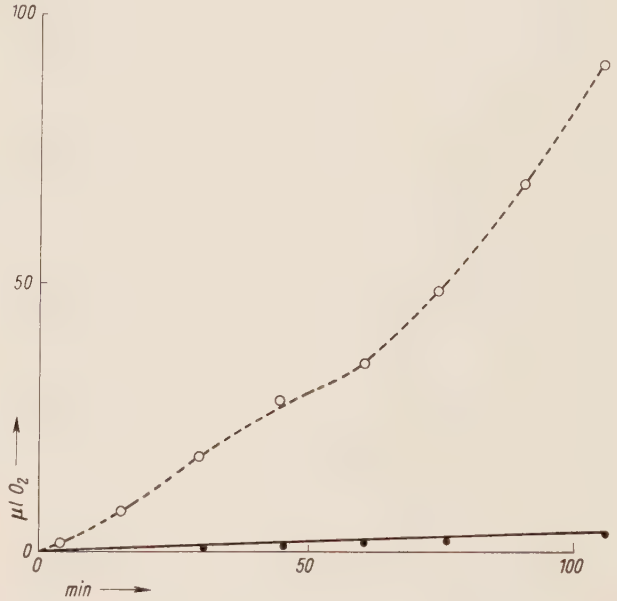



Fig. 1. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique par le complexon (·——· 0,1 $\mu M$); $Cu^{++}$ 0,1 $\mu M$. o---o sans complexon; pH 6,20, 36,5° C

On peut citer comme exemple de la première catégorie l'inhibition par l'aneurine, dont Gero a montré qu'elle est due à la formation d'un complexe entre la vitamine $B_1$ et les ions $Cu^+$[4]. Les Figures 1, 2 et 3 montrent l'inhibition par l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA). Pour obtenir la cinétique de l'inhibition, nous avons placé dans l'un des diverticules d'une fiole de Warburg le $Cu^{++}$, dans l'autre l'inhibiteur. Le compartiment central contient l'acide ascorbique et le tampon. Au bout de 10 min d'équilibration thermique on ajoute le $Cu^{++}$, on mesure l'oxydation de l'$AH_2$, puis à un moment déterminé on ajoute l'inhibiteur de l'autre diverticule. L'inversion de l'ordre des réactifs (inhibiteur d'abord, $Cu^{++}$ ensuite) complète l'expérience. L'étude des courbes obtenues permet de tirer des conclusions intéressantes sur le mécanisme de l'inhibition.

La Figure 1 montre l'inhibition de l'oxydation de 5 mg d'acide ascorbique (28 $\mu M$) en fonction du temps, pour 0,05 $\mu M$ de complexone, 0,1 $\mu M$ de $Cu^{++}$. L'inhibition augmente progressivement pour atteindre la valeur théorique au bout de 40 min environ. Comme l'affinité de l'EDTA est très élevée pour les ions $Cu^{++}$ ($\log K = 18,7$[5]) et comme l'inhibition atteint la valeur théorique de 50% (avec 0,5 $\mu M$ d'EDTA, 1 $\mu M$ $Cu^{++}$ et 28 $\mu M$ $AH_2$) étant probable que l'affinité de l'$AH_2$ pour le $Cu^{++}$ soit de beaucoup inférieur à celle de l'EDTA. Le $Cu^{++}$ ajouté à un mélange de EDTA et d'$AH_2$ se fixe presque exclusivement sur le premier et l'inhibition est d'emblée à sa valeur théorique (Fig. 2) comme d'autre part l'inhibition n'est pas instantanée si on ajoute l'EDTA en dernier, il s'ensuit que le «complexe activé» $[AH\ Cu^+]$ doit être beaucoup moins

* Note N° 2 sur l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique. Note N° 1, voir réf. [3].

[1] A. K. Sijpesteyn, M. J. Janssen et G. J. M. van der Kerk, Biochim. biophys. Acta *23*, 550 (1957).

[2] E. Niadas et L. Robert, Bull. Soc. Chim. biol. (1958), sous presse.

[3] E. Niadas, C. R. Acad. Athènes *31*, 454 (1956).

[4] E. Gero, C. R. Acad. Sci., Paris *235*, 397 (1952); Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1003, 1035 (1954).

[5] R. W. Schmid et C. N. Reilley, J. Amer. chem. Soc. *78*, 5513 (1956).

dissociable que le complexe [AH⁻Cu⁺⁺]. L'activation du complexe doit être rapide et la réaction limitant la vitesse d'oxydation devrait donc être la dissociation du complexe activé. La Figure 3 montre la stoichiométrie de l'inhibition par l'EDTA. L'inhibition n'atteint pas les 100%,

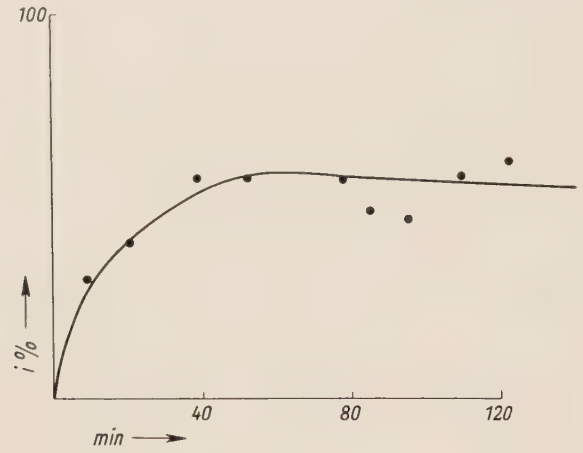



Fig. 2. Cinétique de l'inhibition par le complexon. Ordonnées: inhibition en %; Abscisses: temps en minutes après l'addition du complexon (0,05 $\mu M$); acide ascorbique 5 mg, $Cu^{++}$ 0,1 $\mu M$.

même avec un excès de complexant. Ceci peut être due à une faible activité catalytique du complexe Cu–EDTA ainsi qu'à l'autoxydation de l'$AH_2$[2].

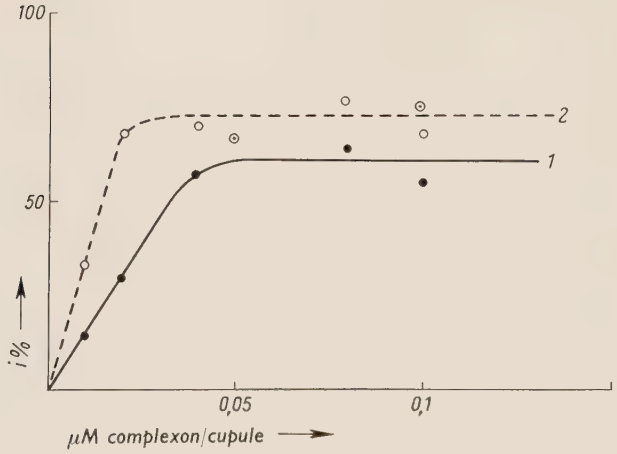



Fig. 3. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique (5 mg) en fonction de la concentration en complexon. $Cu^{++}$ 0,1 $\mu M$, pH 6,35, 36,5° C.

o---o vitesse initiale d'oxydation } résultats obtenus par la méthode
•——• $Q_{120}$ } de Warburg;
⊙ ⊙: résultat obtenu par la méthode spectrophotométrique.

Flitman et Frieden[6] trouvent des résultats analogues aux nôtres avec la différence qu'en milieu alcoolique l'inhibition par le complexone semble être instantanée. Mais à part la présence de 50% d'alcool dans le milieu, ces auteurs ajoutent 2 moles de complexone par g atomes de $Cu^{++}$. En répétant ces expériences par la même méthode (disparition de la bande de l'$AH_2$ à 265 mμ) nous trouvons les résultats suivants (Tableau).

Les inhibitions ainsi obtenues sont de même ordre que celles constatées par la méthode manométrique (voir Fig. 3).

[6] R. Flitman et E. Frieden, J. Amer. chem. Soc. *79*, 5198 (1957).

*Tableau*

Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique (0,35 $\mu M$) par le complexone. Méthode spectrophotométrique, tampon «tris» 0,01 $M$, pH 7,6 (33,5 $\mu M$), volume final 3,35 ml, $t$: 21,5° C

| $Cu^{++}$ $\mu M$ | Complexone $\mu M$ | Complexone ($Cu^{++}$) | $Kms^{-1} \cdot 10^{-3}$ | % inhibition |
|---|---|---|---|---|
| 0,02 | — | | 5,2 | — |
| 0,02 | 1,0 | 50 | 0,0 | 100 |
| 0,02 | — | — | 4,5 | — |
| 0,02 | — | — | 5,1 | — |
| 0,02 | — | — | 5,1 | — |
| 0,02 | 0,01 | 0,5 | 1,67 | 67 |
| 0,01 | — | — | 1,3 | — |

Les résultats sont différents si on utilise une protéine comme inhibiteur. La Figure 4 montre l'effet de la sérumalbumine sur l'oxydation cuprique de l'$AH_2$, l'inhibition est instantanée même si l'on ajoute la protéine en dernier. Pourtant l'affinité de la sérumalbumine pour le $Cu^{++}$ n'est pas plus élevée que celle de l'EDTA: $\Delta F°$ de l'association albumine $Cu^{++}$ à 26° C est selon Klotz[7] de – 5,908 cal/mol pour le premier ion fixé et de – 1,700 cal/mol pour le 16e donc log K est de l'ordre de 10 pour le premier ion

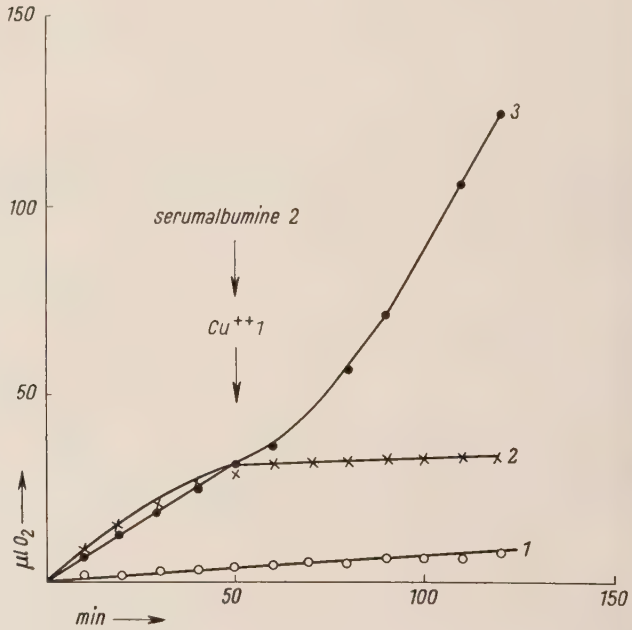



Fig. 4. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique (5 mg) par la serumalbumine de bœuf (2 mg) $Cu^{++}$ 0,1 $\mu M$; 36,5° C.
1. $Cu^{++}$ ajouté à 50 min (flèche) pH 6,05;
2. sérumalbumine ajoutée à 50 min (flèche);
3. acide ascorbique sans sérumalbumine.

fixé. Pour expliquer ce phénomène nous suggérons l'hypothèse de l'interaction de la sérumalbumine avec le complexe [AH⁻ $Cu^{++}$] et non seulement avec le $Cu^{++}$ libre. Des expériences ultérieures sont nécessaires pour étayer cette hypothèse. L'importance biologique de ce 2e type d'inhibition serait grande, car le radical libre AH pourrait être stabilisé au sein de ce complexe et réagir avec des donneurs et accepteurs d'électrons, comme c'est le cas dans la réaction DPNH-oxydasique[8] où l'AH joue

[7] I. M. Klotz, Cold Spring Harbor Symp. Biol. *14*, 97 (1949).
[8] H. Kersten, W. Kersten et Hj. Staudinger, Biochim. biophys. Acta *27*, 598 (1958).

le rôle d'un transporteur d'électrons. Cette hypothèse est étayée par les constatations récentes de KERTESZ[9]; cet auteur a pu montrer que le cuivre de la polyphénoloxydase se trouve sous la forme cupreux, même en présence de substrat et d'oxygène. Des expériences sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

E. NIADAS* et L. ROBERT

*Service de Chimie, Faculté de Médecine, Paris, le 5 août 1958.*

*Summary*

The authors studied the kinetics of the inhibition of the copper-catalysed oxydation of ascorbic acid by versene and some proteins. The versene-inhibition attains slowly the theoretical value, when added after the $Cu^{++}$ to ascorbic acid. Proteins inhibit non-competitively and completely, when added to the vitamine either after or before the copper. This result may be interpreted as indicating an interaction between protein and the complex ($AH^-$ $Cu^{++}$).

[9] D. KERTESZ, Nature *180*, 506 (1957).
* Adresse actuelle: 54, rue Solomou, Athènes (Grèce).

## Mast Cell Destruction Caused by Distilled Water

It is well known that histamin liberators[1,2], anaphylactic shock[3], and intraperitoneal injection of distilled water[2,4] produce disruption of mast cells. The explanation for this latter phenomenon is not yet at hand. For this reason we wanted to discover whether the primary cause of mast cell destruction is the shock caused by intraperitoneal injection of distilled water or the osmotic effect of the water.

Albino rats weighing 220–260 g were used in this study; 10–10 animals in each series. In the first experimental series, 10 ml distilled water/100 g of weight were injected intraperitoneally and afterwards the animals were killed 1, 2, 3, or 4 h later. In the second series the animals were killed 10 min after the injection. Their mesenteries were kept in distilled water for 4 h stretched on a cork plate. In the third series, the rats were killed without intraperitoneal injection and their mesenteries were also kept in distilled water. Finally the mesenteries were stretched on glass slides, fixed in methanol, and stained with alcoholic toluidin blue.

In the first and second series, we have experienced that the destruction of mast cells occurred similary as FAWCETT[2] and HILL[4] had described, nevertheless we have to point out that some of the animals showed no signs of mast cell disruption, but minor granula expulsion only. On the other hand, in the third series, minor granula expulsion and swelling was the only morphological symptom.

These findings indicate that the shock caused by intraperitoneal injection of distilled water plays an extraordinary great role in the mast cell destruction. The osmotic effect without shock produces a much slower mast cell destruction than with it.

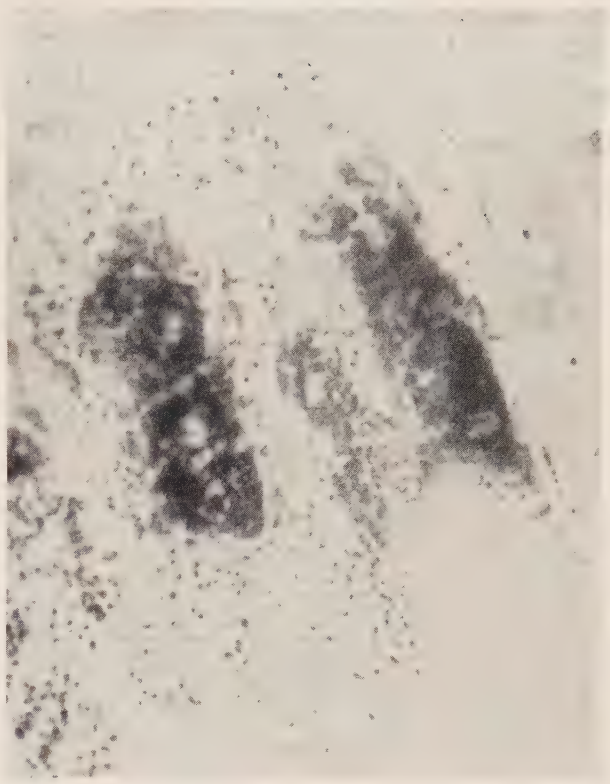


Fig. 1.—Mesentery mast cells of rat killed after 4 h after distilled water injection. (× 900.)

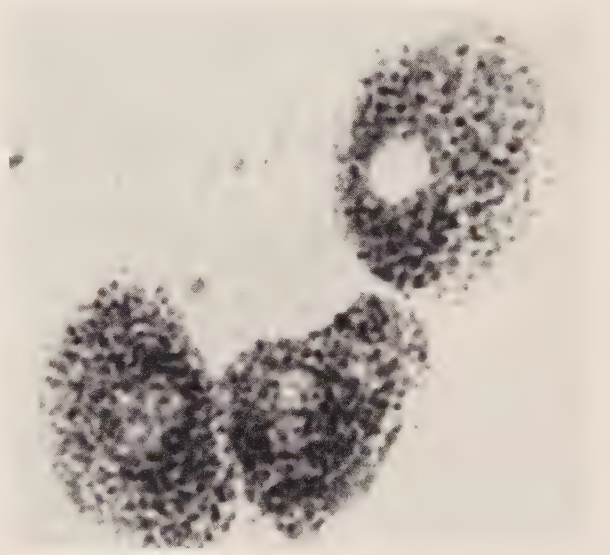


Fig. 2.—Mesentery mast cells of rat killed without intraperitoneal distilled water injection and afterwards keeping 4 h in distilled water.

It is possible that the lack of disruption of mast cells, which sometimes occurred in the first and second series, can be attributed to diminished disposition of these rats to get a shock reaction.

G. GONDA and L. MAGOS

*Department of Pathology, Laszlo-Hospital for Infectious Diseases and Department of Industrial Hygiene, State Institute of Occupational Medicine, Budapest, June 23, 1958.*

[1] J. F. RILEY, J. Path. Bact. *65*, 471 (1953).
[2] D. W. FAWCETT, J. exp. Med. *100*, 217 (1954).
[3] I. MOTA, Brit. J. Pharmacol. *12*, 453 (1957).
[4] M. HILL, Exper. *13*, 395 (1957).

*Zusammenfassung*

Intraperitoneal injiziertes *aqua destillata*, welches Schock hervorruft, führt zu einem starken Mastzellenzerfall. Derselbe bleibt bei osmotischer Wirkung ohne Schock wesentlich geringer.

## Labelling of Insect Spermatozoa by Adenine-8-$^{14}$C

Experiments on the behaviour of the male pronucleus in the egg may be facilitated by the use of radioactively labelled sperm. The procedure for labelling spermatozoa of the spider beetle *Ptinus hirtellus* Sturm (recently changed to *P. clavipes* Panzer[1]) and *Drosophila melanogaster* is presented here.

Of the various tracers used to label spermatozoa of vertebrates (phosphorus-32[2], methionine-$^{35}$S[3,4], adenine-8-$^{14}$C[5], formate-$^{14}$C[4]), adenine-8-$^{14}$C is most suitable because its half-life is sufficient for the long time interval between the administration of tracer and the preparation of autoradiographs. During spermatogenesis, adenine is incorporated into DNA at spermatogonial or pre-leptotene stages[4]. Later work has shown that labelling of the DNA of spermatozoa with thymidine-$^{3}$H is also feasible[6]. Recently, after feeding newly eclosed *Drosophila* with phosphorus-32, Oftedal and Mossige[7] have detected by counter measurements what presumably is DNA-$^{32}$P in spermatozoa; the interval before the ejaculation of labelled spermatozoa occurs points to incorporation during premeiotic stages.

After examination of the larval testes of *P. hirtellus* in aceto-orcein squashes, larvae which were more than half-grown, and therefore possessed mainly spermatogonia, were chosen for the work. About 0·01 cm$^3$ of a solution of adenine-8-$^{14}$C (10 μc/cm$^3$; 9·6 μc/*mM*) was injected into each larva, using a microneedle. Feeding tracer (as with *Drosophila*, see later) was not possible in this species owing to the dry culture medium[8] used.

The larvae became pupae about 45 days later and the males emerged about 100 days after injection. Testes were fixed in alcohol-acetic acid (3:1), and sections, squashes, or smears were made. Autoradiographs of these were prepared with Kodak AR.10 film and exposed for up to 24 days. The preparations were then stained with methyl green-pyronin and examined with phase microscopy. Only about 20–25% of the sperm masses were labelled. As a higher percentage was required, a second batch of larvae were given one injection, as before, and a second identical dose 30 days later. Pupation and emergence were delayed, and there was a 35% mortality. Autoradiography of the testes showed almost all sperm masses heavily labelled (Fig. 1).

Labelling of the first-produced spermatozoa in *Drosophila* imagos was obtained by feeding larvae from hatching on a dead yeast medium[9] with added adenine-8-$^{14}$C (10 μc/cm$^3$ of medium). Testes of just eclosed to 2-day old flies were fixed in alcohol-acetic acid, sectioned at 5 μ, prepared for autoradiography, and exposed for up to 12 days. DNA of sperm bundles was heavily labelled, as seen in Figure 2, which shows the autoradiograph of a section of the testis after previous treatment with ribonuclease. Tracer is also present in the DNA of other cells, and perhaps also in other materials not removed by the enzyme. The testis of adult *Drosophila* is unfavourable material for the study of individual spermatozoa even in squashes or smears. However, positive autoradiographs were obtained on dispersed bunches of spermatozoa in the vagina and seminal receptacle of females paired with adenine-fed males (Fig. 3).

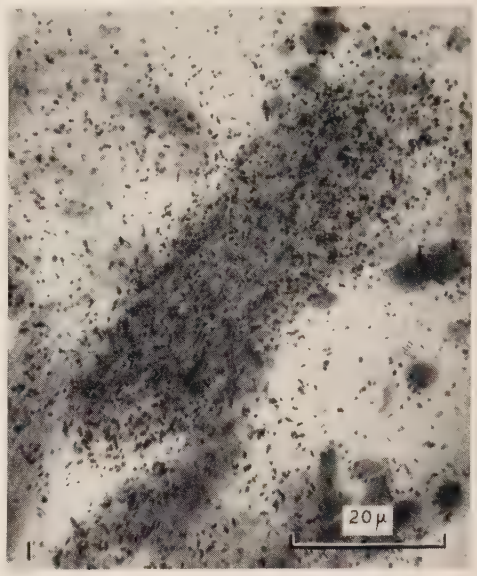



Fig. 1.—Autoradiograph of sectioned testis of *P. hirtellus* showing a sperm mass heavily labelled.

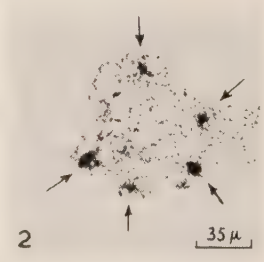



Fig. 2.—Autoradiograph of sectioned testis of *D. melanogaster* after treatment with ribonuclease, showing labelled sperm bundles.

Some observations on spermateleosis in *P. hirtellus* warrant mention. The specialized nature of the spermatozoa in *P. tectus* has been reported earlier[10]. Although the mature spermatozoa in *P. hirtellus* is also of this type, e.g. 'all head', it appeared that the mode of transformation of the spermatid into the spermatozoon differs from the other species. In *P. hirtellus* the entire spermatid nucleus progressively elongates and is directly transformed into

[1] B. P. Moore, Proc. R. ent. Soc. Lond. [B] *26*, 199 (1957).
[2] A. Howard and S. R. Pelc, Brit. J. Rad. *23*, 634 (1950).
[3] A. Glucksmann, A. Howard, and S. R. Pelc, J. Anat. *89*, 13 (1955).
[4] J. L. Sirlin and R. G. Edwards, J. exp. Zool. *137*, in press (1958).
[5] J. L. Sirlin and R. G. Edwards, Exp. Cell Res. *9*, 596 (1955).
[6] J. L. Sirlin, Exp. Cell Res. *15*, 250 (1958).
[7] P. Oftedal and J. C. Mossige, *Advances in Radiobiology* (Oliver and Boyd, Edinburgh 1956), p. 457.
[8] B. P. Moore, G. E. Woodroffe, and A. R. Sanderson, Nature *177*, 847 (1956).
[9] T. Alderson, Nature *179*, 974 (1957).
[10] J. Dlugosz and J. W. Harrold, Proc. R. Soc. Edinb. [B] *64*, 353 (1952).

the mature spermatozoon, while all the cytoplasm of the spermatid is discarded except that which will later form the delicate membrane of the spermatozoon and the small

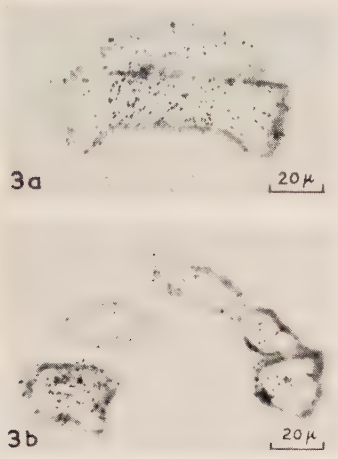



Fig. 3 *a* and *b*.—Autoradiograph of sectioned seminal receptacle of a female *D. melanogaster* showing labelled spermatozoa.

(3–5 μ) persisting tail remnant[11]. An early spermatid after nuclear elongation has started is shown in Figure 4, and on average 10–15 grains associated with the nucleus were

Fig. 4.—Autoradiograph of an early spermatid of *P. hirtellus* (smear).

observed. In more fully developed spermatozoa, in which the nucleus has greatly elongated, 20–25 grains were observed (Fig. 5 and 6). Though there has been an increase

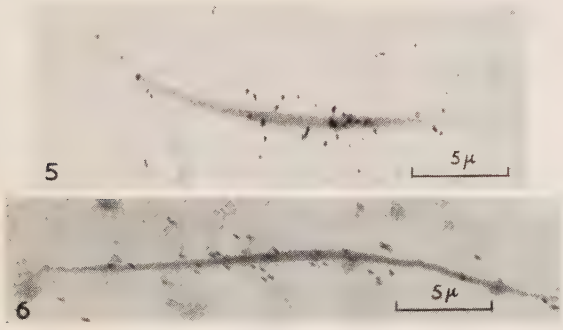



Fig. 5 and 6.—Autoradiographs of two stages of immature spermatozoa of *P. hirtellus* (smear).

[11] J. Jacob, Cytologia, in press (1958).

in nuclear content the amount of DNA has presumably not increased[4] (the intensity of staining decreasing with maturation) and the RNA investment of the nucleus has become much thinner[11]. The increase in tracer content may therefore indicate that the two generations of cells which gave rise to the less developed and more fully developed spermatozoa have incorporated different amounts of tracer in DNA, which could have been caused by the timing of the two injections.

We wish to thank Professor C. H. Waddington, F.R.S., for his interest, the Royal Commission for the Exhibition of 1851 for a research award to one of us (J. J.), and the Medical Research Council for a grant made to Dr. Ann R. Sanderson, Queen's College, Dundee.

J. Jacob and J. L. Sirlin*

*Institute of Animal Genetics, Edinburgh, June 18, 1958.*

*Résumé*

La technique de marquage avec de l'adénine-8-$^{14}$C des spermatozoïdes mûres du coléoptère *Ptinus hirtellus* et de *Drosophila melanogaster* est décrite. L'isotope était administré par injection dans les larves de *Ptinus* et par bouche dans celles de *Drosophila*.

* Research Worker of the British Empire Cancer Campaign.

## What Constitutes a Network in the Acinar Cells of Amphibian and Mammalian Pancreas?

Bowen[1], Beams[2], Duthie[3], Subramaniam[4], Chodnik[5], and Nassonov[6], all of whom have worked on vertebrate pancreas, described the so-called 'Golgi apparatus' as a reticulum consisting of solid strands. According to Lacy[7], however, it is in the form of canals. On the other hand, some modern cytologists like Baker[8, 9], Nath[10], and Thomas[11] have denied categorically the existence of such net-like and canalicular 'Golgi apparatus' in both the somatic and germ cells. Hirsch[12] and Morgan[13] have likewise stated that such structures are non-existent in mammalian pancreatic cells. The reasons put forward by the antagonists of the 'Golgi networks' for the appearance of such structures in pancreas can be summarized as follows:

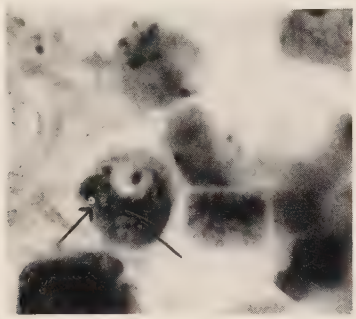
(1) Silver and osmium, used in the classical 'Golgi' techniques, over-impregnate the lipid bodies or the neutral red granules and also fill up the spaces in between them[8, 12, 13].

(2) Golgi network may be formed simply by the deposition of silver or osmium between crowded secretion granules[8].

[1] R. H. Bowen, Quart. J. micr. Sci. *70*, 75 (1926).
[2] H. W. Beams, Anat. Rec. *45*, 137 (1930).
[3] E. S. Duthie, Proc. R. Soc. (London) [B] *114*, 20 (1933).
[4] M. K. Subramaniam, Proc. Indian Acad. Sci. *9*, 271 (1939).
[5] K. S. Chodnik, Quart. J. micr. Sci. *89*, 75 (1948).
[6] D. N. Nassonov, Arch. mikr. Anat. *97*, 136 (1923).
[7] D. Lacy, J. R. micr. Soc. *74*, 226 (1953).
[8] J. R. Baker, Nature *172*, 617 (1953).
[9] J. R. Baker, Symp. Soc. exper. Biol. *10*, 1 (1957).
[10] V. Nath, Nature *180*, 967 (1957).
[11] O. L. Thomas, Quart. J. micr. Sci. *89*, 333 (1948).
[12] G. C. Hirsch, *Form- und Stoffwechsel der Golgi-Körper* (Berlin 1939).
[13] W. S. Morgan, Quart. J. micr. Sci. *94*, 269 (1953).

(3) Worley[14] is of the opinion that the 'Golgi reticulum' is produced by the ruptured and elongated Golgi vesicles, and sometimes even the 'puddingstone' masses, as he observed in the active cells of frog pancreas, may appear in the form of a 'reticulum'.

I have studied the acinar cells of frog, toad, common house rat, and white rat pancreas by employing Aoyama, formaldehyde-osmium, Champy/iron-haematoxylin, formaldehyde-calcium/Sudan black, Lewitsky-saline/Sudan black[15] or iron-haematoxylin and Regaud/iron haematoxylin or Sudan black techniques. To me it appears that in addition to the above reasons, the 'Golgi networks' may be formed in the amphibian pancreatic acinar cells due to the following causes also:



(1) When the zymogen synthesis starts in the cells, the medulla of the lipid vesicles, inside which the proteins are being synthesized, grows, and the outer sudanophil, osmiophil, and argentophil cortex, which is ultimately reduced to a thin crescentic cap, is seen attached to the maturing zymogen granules. These residual lipid crescents detach from the extruding zymogen granules and aggregate haphazardly in the supra-nuclear region. Such an aggregation of the lipid remnants, if superficially observed, gives the appearance of the so-called disintegrated 'Golgi apparatus', said to have been observed during the resting phase or early discharge phase[1,4].

(2) With the onset of the discharge phase, there appear in the supra-nuclear zone, popularly known as 'Golgi zone' (free from zymogen granules), filamentous mitochondria which lie loosely interwoven and interspersed with the lipid granules and spheres. These mitochondria are stainable with acid fuchsine after Regaud, whereas the lipid bodies are not. These filamentous mitochondria, as well as the lipid bodies, are blackened in osmium tetroxide preparations to give the appearance of a typical 'Golgi network'. But the truth is revealed when such preparations are bleached with saturated solution of potassium persulphate and coloured afterwards with Sudan black B. This dye colours only the lipid bodies whereas the mitochondria remain uncoloured and hence there is no 'Golgi network'.

A very striking example of the filamentous mitochondria, appearing in the form of a 'network' (Golgi), is shown in the Figure, which is of a cell in recovery phase from Lewitsky/iron-haematoxylin preparation of white rat pancreas. Though this reticulum resembles closely the typical 'Golgi network', yet it is certain that it is composed of only the mitochondria, as no previous worker has ever described the 'Golgi network' in Lewitsky/haematoxylin preparations. If the fibrillar mitochondria can give the appearance of a 'network' in such *harmless* techniques, one can very well imagine the appearance which this 'loose network' of the mitochondria would give, when drastic techniques like Kolatchev, Aoyama, Da Fano etc., involving long metallic deposition, are employed.

My observation on the acinar cells of anurans and rat pancreas have thoroughly convinced me that most of the 'Golgi networks', appearing in osmium techniques, in the acinar cells during the late discharge and early recovery phases, are nothing but over-impregnated mitochondrial fibres.

Similar reasons for the appearance of the 'Golgi network' in neurones have been given by Thomas[11] and Cain[16].

K. C. Kanwar

*Department of Zoology, Panjab University, Hoshiarpur (India), June 25, 1958.*

*Résumé*

Il a été montré que l'appareil réticulaire classique de Golgi dans les cellules pancréatiques des amphibies et des mammifères est un produit artificiel. Un certain nombre de raisons sont proposées pour expliquer ce fait.

[14] L. G. Worley, J. Morph. *75*, 261 (1944).
[15] J. R. Baker, Quart. J. micr. Sci. *97*, 621 (1956).
[16] A. J. Cain, Quart. J. micr. Sci. *89*, 421 (1948).

## Sur l'interaction de la Protamine avec des protéines sériques

De nombreux polyélectrolytes présentent des interactions avec les protéines sériques. Les plus connues de ces interactions sont la précipitation sélective des $\beta$-lipoprotéines par l'héparine ou le sulfate de dextrane en présence de $Ca^{++}$ ou bien par certains autres polysaccharides sulfatés[1].

Ces mêmes polyélectrolytes présentent une interaction notable avec le complexe haptoglobine sérique-hémoglobine, dont elles empêchent la formation et inhibent son activité peroxydasique[2]. Comme l'haptoglobine est un mucoïde $\alpha_2$ de pH isoélectrique 4,1, on comprend que l'interaction électrostatique ne soit pas le seul facteur déterminant l'affinité des polyélectrolytes pour les protéines sériques[3].

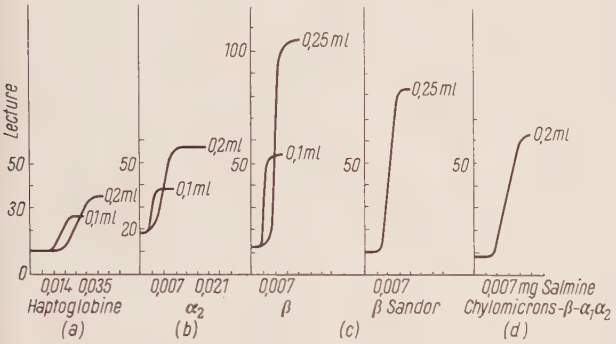
Deux d'entre nous ont montré que la salmine ajoutée à un sérum humain normal ou pathologique produit une opacification initiale, suivie (pour une certaine concentration de salmine, 2 mg/ml) à 37°C d'une clarification[4]. L'étude physiopathologique de cette réaction fut effectuée par de Gennes et Truffert[4]. D'autre part, nous avons entrepris des expériences dont nous présentons ici les résultats préliminaires afin de préciser au point de vue physicochimique la nature de l'opacification et de la clarification.

Nous avons cherché tout d'abord à préciser quelles sont les protéines du sérum qui seraient susceptibles de former avec la salmine un complexe insoluble dans les conditions

[1] P. Bernfeld, V. M. Donahue et M. E. Berkowitz, J. biol. Chem. *226*, 51 (1957).
[2] L. Robert, V. Bajic et M. F. Jayle, C. R. Acad. Sci. *242*, 2868 (1957).
[3] M. F. Jayle et G. Boussier, Exposés annuels de Biochimie Médicale (1956).
[4] J. L. de Gennes, Presse méd. *65*, 263 (1957). – J. L. de Gennes et J. Truffert, C. R. Soc. Biol. *148*, 1361 (1954); C. R. Soc. Biol. *149*, 648 (1955).

mêmes où l'opacification et la clarification furent observées[5].

Nous avons donc établi des courbes de titrage néphélométrique d'un certain nombre de protéines isolées et purifiées. Les protéines, dissoutes dans l'eau distillée ou dans un milieu salin dilué (volume final 10 ml), aux environs de pH 6,0, furent placées dans la cuve cylindrique du néphélomètre Electrosynthèse (dont la photocellule entoure complètement la cuve cylindrique) et avons ajouté des quantités croissantes de salmine diluée (solution à 3,5 g/l diluée extemporanément 20 fois avec de l'eau distillée) à l'aide d'une micropipette à constriction. On lit la turbidité après chaque addition sur un galvanomètre A.O.I.P. (sensibilité 0,6 $10^{-3}$ A/mm, shunté selon les expériences à $^1/_3$ à $^1/_{30}$).




Courbe de titrage néphélométrique des lipoprotéines et de l'haptoglobine. Abscisses: mg salmine ajoutée. Ordonnées: turbidité du système, exprimée en unités arbitraires de lecture du galvanomètre.

*a* Haptoglobine humaine mélange des types Hp II – Hp II et Hp II – Hp I, 80% pur; solution à 3 mg/ml dans l'eau distillée.

*b* $\alpha_2$ lipoprotéine du sérum humain obtenue par ultracentrifugation entre les densités de 1,100 et 1,063, solution de 0,6 mg/ml.

*c* $\beta$:$\beta$-lipoprotéine du sérum humain, obtenue par ultracentrifugation à une densité de 1,063 en solution dans le mélange salin KBr–NaCl à 8,77 g/l; 70 mg/ml, dont 76,5% de lipides. Concentration saline au cours du titrage: 0,08 à 0,43 g/l.

*c* $\beta$-Sandor: Euglobuline III de Sandor[6], solution à 70 mg/ml dans un tampon phosphaté à 0,01 *M* pH 7.

*d* Mélange de chylomicrons, de $\alpha$- et de $\beta$-lipoprotéines obtenus par ultracentrifugation du sérum humain à une densité de 1,135. Concentration globale en lipides: 15 mg/ml.

Parmi les protéines purifiées que nous avons pu examiner, les suivantes ont donné des résultats intéressants:

Les sérumalbumines humaine (CNTS) et bovine (Armour) ne donnent pas de turbidité dans ces conditions, même si l'on ajoute de la protamine concentrée jusqu'à 3 mg pour les 2 mg de sérumalbumine.

La $\gamma$-globuline humaine non plus jusqu'à une quantité de 52 mg de protamine pour 20 mg de $\gamma$-globuline (dans l'eau distillée à pH 7,3).

Des résultats négatifs furent obtenus avec les mucoïdes sériques sulfosalicylosolubles ou perchlorosolubles, concentrés et dialysés. Par contre l'haptoglobine (mélange de Hp I–II/Hp II–II) partiellement purifiée, préparée par Boussier[7], donne une opacification très nette. La courbe *a* de la Figure montre la courbe de titrage néphélométrique obtenue.

Les lipoprotéines donnent aussi une opacification avec de très faibles quantités de salmine. Les courbes *b*, *c*, *d* de la Figure donnent les résultats obtenus avec différentes préparations.

Baisse de l'intensité d'opacification par le sulfate de dextrane et le cetavlon après l'incubation du sérum avec la salmine à 37° pendant 24 h

| Nom | Sulfate de Dextrane % de baisse | Cetavlon % de baisse |
|---|---|---|
| MIG. | 16,6% | 22% |
| REB. | 17 % | 28% |
| GAS. | 10 % | 28% |
| GUE. | 17 % | 19% |
| GRO. | 13 % | 36% |
| ART. | 14 % | 30% |
| DUM. | 14 % | 21% |
| HUP. | 28 % | 38% |
| PRA. | 13 % | 43% |
| LUC. | 18 % | 0% |
| PRO. | 19 % | 32% |
| COL. | 18 % | 38% |
| GON. | 21 % | 36% |
| DEG. | 10 % | 50% |
| BOU. | 20 % | 32% |
| SER. | 15 % | 35% |
| DUM. | 14 % | 40% |
| COR. | 17 % | 50% |

Les réactions ont été faites après une incubation de 24 h à l'étuve à 37° C de 1 ml de sérum + 0,2 ml de salmine à 1%.

Qualitativement toutes ces courbes sont semblables: elles ont une forme en S, avec une branche horizontale (correspondant à la quantité minimum de salmine nécessaire pour induire l'opacification), une partie montante et une branche asymptotique.

L'analyse quantitative de ces courbes, qui sera décrite dans une note ultérieure[8], montre que la salmine précipite avec la $\beta$-lipoprotéine dans un rapport stœchiométrique bien défini.

Les études de Ross[9] ont montré qu'un grand nombre de protéines précipitent avec la protamine dans un rapport moléculaire bien défini à un certain pH. Pour la $\beta$-lipoprotéine du sérum normal ce «pH de transition» ne peut être très éloigné de 7, selon nos expériences. Sa valeur exacte est difficile à préciser car l'addition de tampons ou de base et d'acide à la protéine empêche l'opacification avec la protamine.

Parmi les protéines testées, seules les lipoprotéines et l'haptoglobine précipitent dans ces conditions (pH 6–7, solution diluée) avec la protamine. Les mucoïdes à pH isoélectrique bas du filtrat perchlorique et sulfosalicylique ne précipitent pas avec la protamine à ce pH contrairement aux haptoglobines du type Hp II–Hp II, dont le pH i est à 4,1 environ.

Ces résultats nous ont incités à expliquer les changements survenus au niveau du sérum en présence de protamine (opacification suivie de clarification) par les modifications subies par les lipo- et certaines glycoprotéines du sérum. En admettant que l'opacification soit due à une réaction entre la salmine d'une part et certaines lipo- et $\alpha$-glucoprotéines d'autre part, ces protéines doivent être «modifiées» au cours de la clarification. On peut s'attendre à ce que cette modification se traduise par une réactivité diminuée aux test plus ou moins spécifiques utilisés pour leur mise en évidence dans le sérum.

[5] J. L. de Gennes, Thèse de médecine (Paris 1957).

[6] G. Sandor, P. Slizewicz et M. Burstein, Bull. Soc. Chim. biol. *39*, 843, 857 (1957).

[7] G. Boussier, C. R. Acad. Sci., Paris *246*, 1769 (1958).

[8] L. Robert, J. Polonovski et J. Truffert, Bull. Soc. Chim. biol., à paraître.

[9] V. Ross, Arch. Biochem. Biophys. *50*, 34 (1954).

Le Tableau montre en effet que l'incubation du sérum avec la protamine diminue le taux des lipoprotéines (mises en évidence par le test de Burstein modifié par Badin et Schmitt du sulfate de dextrane[10]) et celui des glycoprotéines (dosées par la méthode au cétavlon de Martin et Badin[11]). La baisse constatée par ces 2 méthodes peut être interprétée de plusieurs façons. Parmi les hypothèses possibles nos expériences en cours s'accordent le mieux avec celle admettant la dégradation enzymatique des lipoprotéines après leur floculation par la protamine. Notamment la clarification n'est plus constatée si le sérum est chauffé au préalable à 56° C 30 min et peut être inhibée par le CNK, la quinine et d'autres inhibiteurs des estérases[7]. La clarification évolue d'autre part parallèlement avec la diminution du test au sulfate de dextrane. Un parallélisme semblable n'existe pas pour les glycoprotéines réagissant avec le cetavlon: la baisse est instantanée après l'addition de la protamine et ne varie plus au cours de la clarification.

J. Truffert, J. L. de Gennes, L. Robert et J. Polonovski

*Laboratoire de Chimie de la Clinique Propédeutique, Hôpital Broussais et Service de Chimie, Faculté de Médecine de Paris, le 5 août 1958.*

*Summary*

We noticed the formation of a precipitate on adding salmine to dilute aqueous protein solution at pH 6–7. Human and bovine serum albumin, human $\gamma$-globulin, and the perchloro- and sulfosalicylosoluble mucoides do not precipitate in this condition. $\alpha$- and $\beta$-lipoproteins prepared by floatation and by Sandor's technique gave S-shaped nephelometric titration curves, as did haptoglobin, a mixture of the types Hp II–Hp II and Hp II–Hp I. In sera incubated 24 h at 37°C with protamin, the dextran sulphate test and the cetavlon test show a diminished value for $\beta$-lipo- and $\alpha$-glucoprotein. Lipoprotein degradation is probably enzymatic in nature.

[10] J. Badin et F. Schmitt, Ann. Biol. clin. *15*, 469 (1957).
[11] J. Martin et J. Badin, Ann. Biol. clin. *15*, 675 (1957).

— —

## Ein Beitrag zur irreversiblen Temperaturinaktivierung der Gewebsatmung

Abgesehen von der Untersuchung von Field *et al.*[1] liegt bis heute keine weitere Beobachtung über Erholung einer Gewebsatmung nach Einwirkung einer hohen Temperatur – durch Rückkehr auf eine noch physiologische Temperatur – vor. Es wurde daher die Atmung der Leber und Haut von (Sommer-)Fröschen für $^1/_2$–$2^1/_2$ h bei 47,5°C und anschliessend über eine weitere Stunde bei 37,5° C verfolgt.

Die Messung der Gewebsatmung erfolgte nach dem direkten Verfahren von Warburg in substratfreier Krebs-Phosphatringerlösung, Gasphase: Luft.

Ein typisches Experiment ist in Abbildung 1 angegeben, die Resultate sind in Abbildung 2 zusammengefasst. Hierin bedeutet *A* die durchschnittliche Abweichung der nach der Inkubation bei 47,5°C bei einer Temperatur von 37,5°C gemessenen Atmung gegenüber der normalen Atmung bei gleicher Temperatur. Sie ergibt eine mit Inkubationsdauer zunehmende statistisch signifikante Verminderung. Der Vergleich der Erholungsatmung bei 37,5° C mit der bei 47,5° C gemessenen Atmung des gleichen Zeitraums (Kurven *B*) ergibt an der Hautatmung keine durchschnittliche Abweichung, dagegen bleibt die Leberatmung trotz späterer Rückführung in 37,5°C niedriger als bei 47,5°C. Unmittelbar nach Temperaturwechsel treten, wie Abbildung 1 zeigt, bei 37,5°C schnell vorübergehende Anstiege der Atmung, sogenannte overshoots auf. Abbildung 2 lässt erkennen (Kurven *C*), dass diese besonders nach Inkubation von 1 und $1^1/_2$ h Dauer auftreten.

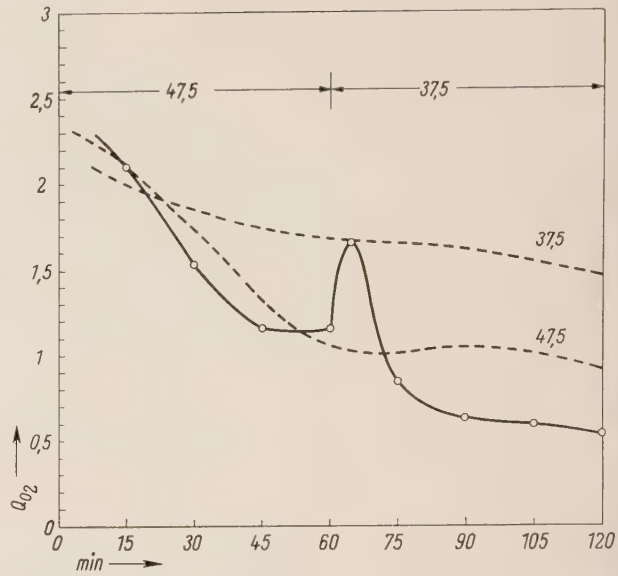



Abb. 1. Änderung der Gewebsatmung der Froschleber bei Überführung von 47,5° C in 37,5° C.

Es ruft demnach schon eine kurze Inkubation der Gewebe bei 47,5°C eine irreversible Enzym-Inaktivierung hervor. In den meisten Fällen kommt es aber zunächst zu einer vorübergehenden Aktivierung im Sinne von overshoot-Phänomenen, welche für den Sauerstoffverbrauch von Tieren bei Temperaturwechsel im suboptimalen Bereich neuerdings von Grainger[2] beschrieben worden sind. Dadurch ähneln die experimentellen Kurven (Abb. 1) sehr stark jenen, welche beim Einfluss hoher Konzentrationen von 4,6-Dinitro-*o*-kresol an der Atmung geschädigter Gewebe auftreten[3], was im Sinne der Theorie von Johnson[4] neuerlich für Gemeinsamkeiten in der Wirkung der Temperatur mit der chemischer Agentien spricht. Der merkwürdige Unterschied im Verhalten der Haut- gegenüber der Leberatmung (Abb. 2, *B*) erklärt sich zum Teil daraus, dass erstere bei 47,5°C einen stärkeren *in-vitro*-Abfall als letztere erfährt[5]. Die eigentliche Ursache für die Verminderung der Leberatmung auch nach Rückführung in 37,5°C gegenüber der gleichzeitigen Atmungshöhe von 47,5°C muss wohl darin erblickt werden, dass die Froschleber in stärkerem Masse als die Froschhaut Enzyme aufweist, deren Gleichgewicht nach dem inaktiven Zustand verschoben ist[5]. Die Temperatur von 47,5°C muss daher durch Verstärkung dieser Inaktivie-

[1] J. Field, F. A. Fuhrman und A.W. Martin, J. Neurophysiol. *7*, 117 (1944).

[2] J. N. R. Grainger, Nature *178*, 930 (1956).
[3] A. Locker und K. H. Spitzy, Exper. *7*, 350 (1951).
[4] F. H. Johnson, H. Eyring und M. J. Polissar, *The Kinetic Basis of Molecular Biology* (New York-London 1954).
[5] A. Locker, Z. Naturforsch. *13b*, 548 (1958); Pflügers Arch. *267*, 358 (1958).

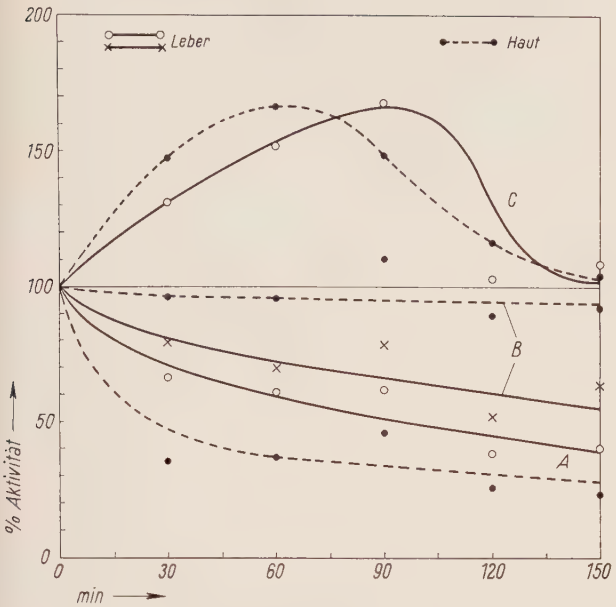



Abb. 2. Prozentuelle Aktivität (Ordinate) der Gewebsatmung der Leber und Haut des Frosches nach Inkubation bei 47,5° C. *A*: Durchschnittliche Erholungsatmung im Vergleich zur Normalatmung bei 37,5° C; *B:* Durchschnittliche Erholungsatmung im Vergleich zur Atmung bei 47,5° C; *C:* Prozentuelle Änderung der Gewebsatmung unmittelbar nach Temperaturwechsel gegenüber dem vorher gemessenen Niveau (sog. «over-shoot»). Abszisse: Inkubationsdauer.

rung an der Gewebsatmung der Froschleber ausgeprägtere Veränderungen als an der der Froschhaut hervorrufen.

A. Locker

*I. Medizinische Klinik der Universität Wien, 31. Juli 1958.*

*Summary*

(1) Tissue slices of the liver and pieces of the skin of summer-frogs were incubated at 47·5°C for 30–150 min. Their respiration was measured during this incubation period and thereafter at a temperature of 37·5°C.

(2) As a sign of an irreversible inactivation of the enzymes, the average respiration was inhibited. However, after certain periods of incubation at 47·5°C, over-shoot phenomena in the $O_2$-uptake at the temperature of 37·5°C were seen.

## Zur Temperaturaktivierung der Substratatmung tierischer Gewebe

Bei Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Gewebsatmung der Leber homoiothermer und poikilothermer Tiere war es aufgefallen, dass die Aktivierungsenergie ($\mu$) bei hungernden Säugetieren höher war als bei normal ernährten[1] und am Sommerfrosch höher als am Winterfrosch[2]. Demnach kann ein Einfluss der (endogenen) Substratkonzentration vermutet werden. Dieser wird auch daraus wahrscheinlich, dass die Aktivierungsenergie der Atmung der Haut von Sommer- und

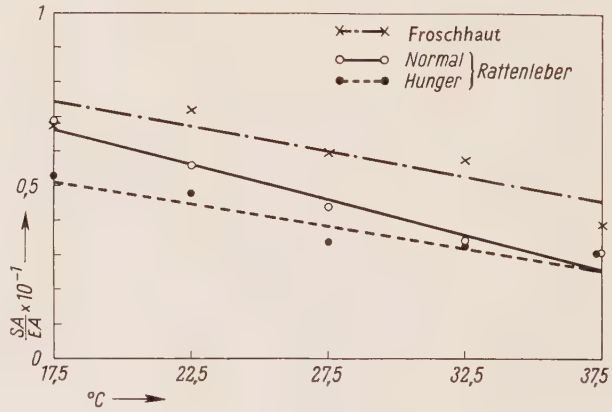
Endogene und Substrat-Atmung der Haut des Winterfrosches und der Leber der 48 h hungernden Ratte im Temperaturbereich 17,5–47,5° C

| Temperatur °C | Froschhaut | | Rattenleber | |
|---|---|---|---|---|
| | EA | SA | EA | SA |
| 17,5 | 0,625 (6) | 4,167 (6) | 1,57 (3) | 10,73 (3) |
| 22,5 | 0,708 (8) | 5,100 (6) | 2,59 (4) | 14,42 (3) |
| 27,5 | 1,007 (8) | 5,934 (5) | 4,97 (10) | 21,76 (4) |
| 32,5 | 1,436 (7) | 8,270 (3) | 6,88 (5) | 23,70 (3) |
| 37,5 | 2,277 (5) | 8,727 (5) | 8,08 (22) | 24,73 (5) |
| 42,5 | 1,116 (5) | 7,172 (8) | 6,44 (7) | 22,19 (5) |
| 47,5 | 0,645 (5) | 7,061 (6) | 2,67 (4) | 19,35 (3) |

EA: Endogene Atmung, SA: Substratatmung, Zahl in Klammer: Versuchsanzahl.

Winterfrosch in Übereinstimmung mit dem Fehlen jahreszeitlicher Differenzen im Glykogengehalt von gleicher Höhe ist[3]. Um die Bedeutung des Substrates näher zu belegen, wurden Untersuchungen über den Temperatureinfluss auf eine durch Substratzusatz stark stimulierte Gewebsatmung angestellt.

Zur Verwendung kam die Haut des Winterfrosches und die Leber 48 h hungernder und normal ernährter Ratten. Die Untersuchung der endogenen und durch jeweils $5 \times 10^{-2}$ *M* Na-Pyruvat und Na-Succinat stimulierten Gewebsatmung erfolgte nach dem indirekten Verfahren von Warburg mit einer Versuchsdauer von 3 h. Sonstige methodische Einzelheiten wie in den genannten Untersuchungen.




Relative Aktivität der Substratatmung im Temperaturbereich 17,5–37,5° C.

Der Temperatureinfluss auf die endogene und die Substrat-Atmung ergibt sich aus der Tabelle. Es geht daraus hervor, dass in jedem Fall das absolute Maximum bei 37,5°C liegt, aber der Aktivitätsanstieg bis zu dieser Temperatur und der Aktivitätsabfall über dem Maximum unter Substratzusatz geringer ist. Ein ganz entsprechendes Verhalten bietet die in die Tabelle nicht aufgenommene Atmung der Leber normal ernährter Ratten. Dieser Erscheinung entspricht eine statistisch stets signifikante Verminderung der Aktivierungsenergie (für den Bereich von 17,5–37,5°C), nämlich an der Froschhautatmung von $\mu$ = 11 840 cal auf 7025 cal, an der Leber der hungernden Ratte von $\mu$ = 15 265 cal auf 7790 cal und an der Leberatmung der normal ernährten Ratte von $\mu$ = 13 235 cal auf 8395 cal. Aus der Abbildung ist zugleich ersichtlich,

[1] A. Locker, Z. exp. Med. *130*, 396 (1958).

[2] A. Locker, Naturwiss. *45*, 371 (1958). – A. Locker und D. Doneff, Z. vgl. Physiol. *41*, 242 (1958).

[3] A. Locker, Pflügers Arch. *267*, 358 (1958); Naturwiss. *45*, 398 (1958).

dass sich die relative Aktivität der Substratatmung mit Temperaturerhöhung von 17,5 auf 37,5°C (nicht jedoch darüber hinaus) vermindert.

Im Lichte der Theorie von Johnson[4] ist die Verhinderung des bei der endogenen Atmung starken Abfalls über dem Maximum durch Substratzusatz, etwa im Sinne einer Protein-Stabilisierung, verständlich. Die Verminderung der Aktivierungsenergie der Substratatmung gegenüber dem Wert der endogenen Atmung lässt sich durch die Annahme verständlich machen, dass durch hohe Substratkonzentration bereits eine Enzymaktivierung eingetreten ist und daher die auf Temperatureinfluss zurückgehende Aktivierung nurmehr ein geringeres Ausmass annehmen kann. Ein Phänomen dieser Art ist seit längerem für die Atmung gewisser Seeigeleier bekannt[5]. Hier ist der Temperaturkoeffizient ($Q_{10}$) der nach der Befruchtung hohen Atmung kleiner als der der niedrigen Atmung des unbefruchteten Eies. Auch tritt nach Aktivierung der Atmung des unbefruchteten Eies mit Pyocyanin eine Verringerung des $Q_{10}$ ein[6]. Andererseits steht jedoch unser Befund im Gegensatz zu einer Untersuchung über ein Zytochromoxydase-Succinodehydrogenase-System aus Rattenlebermitochondrien[7], bei welchem ein höherer $\mu$-Wert erhoben wurde, als er für die endogene Atmung von Leberschnitten bekannt ist. Dagegen wurde an der Gehirnatmung der Ratte für ein Homogenatsystem die gleiche Aktivierungsenergie wie für Gewebsschnitte erhoben[8]. Die Abnahme der relativen Aktivität der Substratatmung mit Temperatursteigerung (Abbildung) steht in Übereinstimmung mit dem Einfluss von 4,6-Dinitro-*o*-kresol auf die Atmung der Säugerleber[9] und Froschhaut[3] unter gleichzeitiger Temperaturvariation.

A. Locker

*I. Medizinische Klinik der Universität Wien, 31. Juli 1958.*

*Summary*

(1) The influence of temperature on tissue respiration of frog skin and rat liver, stimulated by succinate and pyruvate, was studied. The temperatures ranged from 17·5 to 47·5°C.

(2) The activation-energy ($\mu$) of the substrate-stimulated respiration was significantly lower than that of the endogeneous $O_2$-uptake. Therefore, in the submaximal range of temperature, the relative activity of the stimulated respiration decreased with increasing temperatures.

[4] F. H. Johnson, H. Eyring und M. J. Polissar, *The Kinetic Basis of Molecular Biology* (New York-London 1954).

[5] B. B. Rubenstein und R. W. Gerard, J. gen. Physiol. *17*, 677 (1934).

[6] J. M. Korr, Amer. J. Physiol. *133*, P 354 (1941).

[7] A. Bänder und M. Kiese, Arch. exp. Path. Pharm. *224*, 312 (1955).

[8] H. Hoagland *et al.* Amer. J. Physiol. *171*, 624 (1952).

[9] A. Locker, Exper. *14*, 226 (1958); Z. Naturforsch. *13b*, 548 (1958).

## Acetylcholinesterase, Acid Phosphatase, and Succinic Dehydrogenase in the Hypothalamic Magnocellular Nuclei after Serotonin Administration

It is the generally accepted opinion that the antidiuresis produced by serotonin is due to the renal effects caused peripherally by this drug[1,2]. However, Abrahams and Pickford[3] have presented the possibility that the antidiuretic effect of serotonin might, in part, also be a result of the release of antidiuretic hormone from the posterior lobe of the pituitary. In a previous histological investigation, the present authors were able to show that the neurosecretory material, which is considered the carrier substance of the antidiuretic hormone or the hormone itself[4], decreased after serotonin administration in the posterior lobe of the hypophysis as well as in the cytoplasm and the neurites of the cells of the supraoptic and paraventricular nuclei[5,6]. In order to further the understanding of the mechanism of effect of serotonin upon these hypothalamic nuclei, we have continued our work with the object of determining the kind of effect serotonin has on the acetylcholinesterase, acid phosphatase and succinic dehydrogenase enzyme activity in the nucleus supraopticus (n.s.o.) and the nucleus paraventricularis (n.p.v.), where these have been shown previously to occur[7,8,9].

For this study 16 female albino rats of about 200 g weight were used. Half of them served as controls; the other half of the animals received serotonin (5-hydroxytryptamine sulf. c. creatinin sulf., 'Lääke Oy') subcutaneously daily during seven days in a dosage of 0·5 mg/kg (in 0·1 ml). The animals of the control series were given correspondingly 0·1 ml saline solution. Throughout the test the animals received food and beverage *ad libitum*. The animals were killed by rapid decapitation 2 h after the last injection. From the n.s.o. and n.p.v. of the test animals, as well as the controls, the acetylcholinesterase was determined histochemically according to Koelle's modification[10], the acid phosphatase according to Eränkö's modification[11], and the succinic dehydrogenase according to Seligman and Rutenburg[12].

In the control series the acetylcholinesterase, acid phosphatase, and succinic dehydrogenase activity was found to confirm with the earlier findings. On examination of the hypothalami of the animals treated with serotonin the observation was made that, of the investigated enzymes, the acetylcholinesterase and acid phosphatase activity had distinctly increased in both nuclei, whereas no difference between the test animals and the controls was noted with regard to succinic dehydrogenase (Fig. 1–4).

The result just obtained indicates that subcutaneously administered serotonin affects the acetylcholinesterase and acid phosphatase activity of the hypothalamic magnocellular nuclei, increasing these activities. It is generally accepted that the chemical transmitter responsible for stimulation of the hypothalamic cells is acetylcholine, which is decomposed by acetylcholinesterase (e.g.[13,14]).

[1] I. H. Page, Physiol. Rev. *38*, 277 (1958).

[2] V. Erspamer, Pharmacol. Rev. *6*, 425 (1954).

[3] V. C. Abrahams and M. Pickford, Brit. J. Pharmacol. *11*, 35 (1956).

[4] E. Scharrer, Exper. *10*, 264 (1954).

[5] E. Kivalo, U. K. Rinne, and P. Marjanen, Ann. Med. int. fenn. *46*, 191 (1957).

[6] E. Kivalo, P. Marjanen, and U. K. Rinne, Acta endocrinol. *28*, 553 (1958).

[7] V. C. Abrahams, G. B. Koelle, and P. Smart, J. Physiol. *139*, 137 (1957).

[8] O. Eränko, Acta physiol. scand. *24*, 1 (1951).

[9] N. Shimizu and N. Morikawa, J. Histochem. Cytochem. *5*, 334 (1957).

[10] G. B. Koelle, J. Pharmacol. *114*, 167 (1955).

[11] E. Eränkö, Ann. Med. exp. biol. fenn. *29*, 287 (1951).

[12] A. M. Seligman and A. M. Rutenburg, Science *113*, 317 (1951).

[13] M. Pickford, J. Physiol. *106*, 264 (1947).

[14] V. C. Abrahams and M. Pickford, J. Physiol. *133*, 330 (1956).

Fig. 1.—The activity of acetylcholinesterase in the nucleus supraopticus of a control rat. × 72.

Fig. 2.—The activity of acetylcholinesterase in the nucleus supraopticus of a serotonin treated rat. × 72.

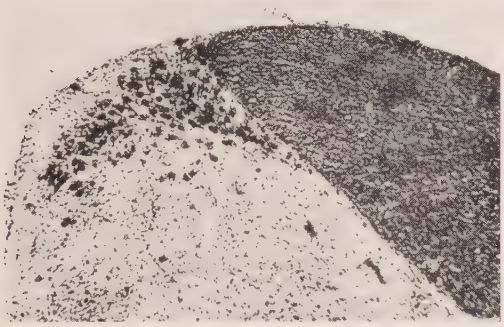


Fig. 3.—The activity of acid phosphatase in the nucleus supraopticus of a control rat. × 72.

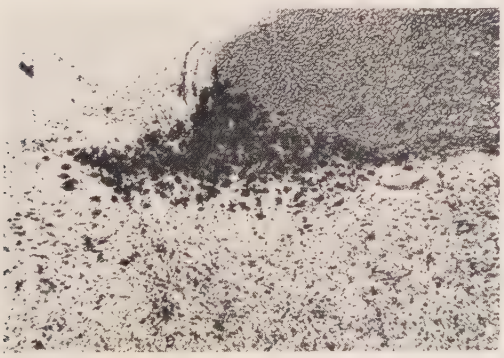


Fig. 4.—The activity of acid phosphatase in the nucleus supraopticus of a serotonin treated rat. × 72.

On the other hand, it is known that acid phosphatase is involved in the protein synthesis mechanism. The fact that serotonin increases the activity of just these enzymes thus tends to strengthen the hypothesis that serotonin stimulates the activity of the nuclei under consideration[5,6]. The activity of the respiratory enzyme, succinic dehydrogenase, is normally fairly slight in the n.s.o. and n.p.v.; therefore it has been assumed that aerobic metabolism has no great significance in the activity of the cells[15]. Also the result obtained in this work can be considered an indication in this direction.

E. Kivalo*, U. K. Rinne*, and S. Mäkelä

*Department of Anatomy, University of Turku (Finland), August 25, 1958.*

*Zusammenfassung*

Es wurde histochemisch festgestellt, dass Serotonin eine mässige Steigerung der Acetylcholinesterase- und sauren Phosphataseaktivität des Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis bewirkt. Es wird an eine Aktivierung des N. supraopticus und N. paraventricularis durch Serotonin gedacht.

[15] N. Shimizu, N. Morikawa, and Y. Ishi, J. comp. Neurol. *108*, 1 (1957).

* Aided by a grant from the Sigrid Jusèlius Stiftelse.

## The Role of Nucleic Acids in Crown-Gall Tumor Induction

In a previous paper[1], the preparation of a tumor inducing principle TIP which was germ-free was described. These experiments, first made on *Pelargonium zonale*, have been extended to other plants. Finally it was decided to use *Datura stramonium*, a plant which reacted well and speedily to inoculations of virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend), the causal agent of Crown-Gall. The germ-free induction of Crown-Gall tumors was achieved by incubating the bacteria for a two-day period at 27°C together with a juice expressed from plants, wounded 48 h beforehand. A sterile filtrate of this mixture was capable of inducing typical tumors on *Datura*. Furthermore it was demonstrated that TIP was not obtained by adding a deoxyribonuclease to the mixture before incubation.

These results have now been confirmed, and in addition the deoxyribonuclease was found to have no effect if added to the mixture after incubation. The fact that this enzyme can inhibit the formation of TIP *in vitro* would emphasize the importance of the role of nucleic acids in Crown-Gall tumor induction. Such results show that the active principle of the bacterium is closely related to the nucleic acids, but it is also clear that the nucleic acids are not identical with TIP and are not alone responsible for the tumor induction. Manil *et al.*[2] have studied this problem and have prepared different fractions of nucleic acids from a mass culture of the organism. The proliferations on plants after inoculation with these preparations were very limited and, as the authors state, not typical. It may be

[1] P. Manigault, A. Commandon, and P. Slizewics, Ann. Inst. Pasteur *91*, 114 (1956).

[2] P. Manil, L. Delcambe, and J. Fourneau, Bull. Acad. R. Belg. Cl. Sci. [5] *41*, 259 (1955).

that the extraction methods[3] used did not produce a native nucleic acid.

The extraction methods used by us were different to those of Manil *et al.*[2]. The nucleic acid we obtained was transferred together with specific 'wound juice'. This gave tumors which were morphologically, histologically, and physiologically identical with tumors induced by the microbe alone.

The strain 5.6 of *Agrobacterium tumefaciens* was first cultivated for 48 h on a nutrient agar at room temperature, transferred to Fernbach flasks and finally to aerated culture bottles which contained 10 l of the following liquid culture medium: $KH_2PO_4$ 2 g, $Na_2HPO_4$ 1·5 g, $KNO_3$ 0·25 g, $K_2SO_4$ 0·5 g, $(NH_4)_2HPO_4$ 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0·25 g, Rochelle salt 2 g, dextrose 40 g, distilled water ad 1000 cm³. The pH was adjusted with KOH to 7·6–8·0. Incubation was for 48 h at 27°C. The bacteria were collected with a Sharpless type centrifuge at 40,000 r.p.m. and washed three times in a Tris-buffer 0,1 *M* at pH 8·0. The organisms were suspended in a solution of 18·6 g Versene (Komplexon III) in sodium-potassium-phosphate-buffer 0,01 *M* at pH 7·4 to which was added 9 g of NaCl in 1 l. The bacterial suspension was then frozen at −60°C and defrozen at room temperature several times to enhance the breakage of the cell walls. Total lysis was realised in a 10% sodium lauryl sulfonate solution at pH 8·0 at 37°C. The very high amount of proteins required frequent deproteinisation with the Sevag method: the liquid was shaken with a mixture of chloroform-amyl alcohol 9:1 and centrifuged until no more protein could be collected in the zone between the two phases. Precipitation of all the nucleic acid was with 1·3 volumes of ethanol at 95%. It was then purified by solution in 0·9% NaCl and reprecipitation several times with ethanol. The final precipitate was dissolved in sterile NaCl 0·9% and stored at 0°C. The 'wound juice' was obtained from 4–6 weeks old plants of *Datura stramonium*. The upper internodes of the stem were slit spirally with a razor blade. 48 h later these internodes were 'homogenized' in a blendor together with solid $CO_2$. After filtering by pressing through a cheeze cloth, 3 cm³ of 'wound juice' were easily obtained from each plant. This sap was clarified in a MSE-centrifuge at 5000 r.p.m. for 15 min. The supernatant was now lyophilized. For each experiment, the dried material was reconstituted with distilled water to the original volume and sterilized by passing through a Seitz-filter. The sterility of each sample was tested.

Three successive experiments were made with 5–7 replications in each. Inoculation of the 4-weeks old plants of *Datura stramonium* was by means of special pipettes. These were closed at the end, but had a hole of similar size at the side. They were pushed into and then fastened to the 'wound' made on removal of one of the upper leaves. Through them 0·3 cm³ of liquid was infiltrated in 24–36 h into each plant. After the liquid had been taken up, the pipettes were removed.

The test series were as follows:

(A) A 48-h old culture on nutrient agar of strain 5.6 of *Agrobacterium tumefaciens* in 0·9% NaCl.

(B) The sterile nucleic acid fraction described alone.

(C) An equal mixture of the nucleic acid fraction and 'wound juice', the nucleic acid being added to the 'wound juice' just before the infiltration of the plant.

The results after a 50-day period were:

(A) In every case tumors had been formed from 10 to 30 mm diameter.

(B) No tumors had been formed on any plant.

(C) Tumors on each plant could be observed, the size varying between 5 and 20 mm diameter.

Photographs of these tumors are probably being published[4].

The following conclusions have been drawn from these results: The function of *Agrobacterium tumefaciens* in the induction of Crown-Gall tumor is due to the nucleic acids and very probably to the deoxyribonucleic acid. However TIP can not be identical with the nucleic acids of *Agrobacterium*, because their infiltration gave rise to no tumors. We suggest that an important protein fraction of the 'wound juice' is modified by the nucleic acid and this becomes the TIP. This is the first time—so far as we know—that a *Crown-Gall tumor* has been *induced without* the presence of the *microbe* in any one of the different phases.

It is intended to determine in the future which nucleic acid is active and to fractionate the important principle of the 'wound juice' as well as to elucidate the reaction mechanism of the induction.

We want to acknowledge our thanks to Dr. P. Schaeffer (Institut Pasteur de Paris) who has been assisting us in developing the nucleic acid extraction method. The second author is grateful for the help and accommodation provided by the Pasteur Institute.

P. Manigault and Ch. Stoll

*Institute Pasteur, Paris, and Institute for special Botany of the E.T.H., Zürich, September 11, 1958.*

*Zusammenfassung*

Die Arbeit befasst sich mit der Induzierung von Pflanzentumoren durch das *Agrobacterium tumefaciens*. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Nukleinsäurefraktion aus dem Bacterium imstande ist, nach Zugabe zu einem Homogenisat von verletzten *Datura-stramonium*-Pflanzen ein Tumor auslösendes Prinzip aufzubauen. Eine derartige (sterile) Fraktion ist in der Lage, echte Crown-Gall-Tumoren zu induzieren, deren Identität mit den bakteriell erzeugten Tumoren morphologisch, histologisch und physiologisch erwiesen ist.

[3] A. Mirsky and A. Pollister, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *28*, 344 (1942).

[4] P. Manigault and Ch. Stoll, Ann. Inst. Pasteur, in press (1958).

## Zur Biosynthese des Ubichinons

Lowe, Morton und Harrison[1] haben im Jahre 1953 gefunden, dass im Unverseifbaren der Leber von Vitamin-A-Mangelratten Substanzen unbekannter Natur angereichert werden, die auf Grund typischer UV.-Spektren erkannt werden können. Die weitere Bearbeitung führte zur Reindarstellung einer Komponente, die später als Ubichinon bezeichnet wurde[2]. Am 18. Juli 1958 wurde in Shef-

[1] J. S. Lowe, R. A. Morton und R. G. Harrison, Nature *172*, 716 (1953).

[2] G. N. Festenstein, F. W. Heaton, J. S. Lowe und R. A. Morton, Biochem. J. *59*, 558 (1955). – N. F. Cunningham, J. S. Lowe, L. Mervyn, R. A. Morton und J. Vernon, Proc. biochem. Soc. *60*, xviii (1955). – F. W. Heaton, J. S. Lowe und R. A. Morton, J. chem. Soc. *1956*, 4094. – J. S. Lowe, R. A. Morton und J. Vernon, Biochem. J. *67*, 228 (1957). – R. A. Morton, G. M. Wilson, J. S. Lowe und W. M. F. Leat, Chem. & Ind. *1957*, 1649.

field von MORTON *et al.*[3] in den Grundzügen die Struktur des Ubichinons bekanntgegeben. Ubichinon wurde als ein tetrasubstituiertes Benzochinon angesprochen, welches in 2- und 3-Stellung eine Dimethoxy-Gruppe und ausserdem eine lange isoprenartige Seitenkette enthält. Von CRANE *et al.*[4] wurde im Jahre 1957 über die Isolierung einer Substanz mit identischem UV.-Spektrum berichtet, von welcher angenommen wird, dass sie in der Atmungskette eine funktionelle Bedeutung hat. Sie wurde als Mitochinon bezeichnet.

Am IV. Internationalen Kongress für Biochemie in Wien (1.–6. September 1958) wurde in der Diskussion von beiden Gruppen die endgültige Struktur mitgeteilt und damit erkannt, dass Ubichinon und Mitochinon identisch sind. Es handelt sich um ein 2,3-Dimethoxy-5-methyl-benzochinon-Derivat, das eine isoprenoide Seitenkette enthält, die im Aufbau derjenigen des Vitamin $K_2$ entspricht, aber aus 50 Kohlenstoffatomen besteht.

Frühere Untersuchungen[5] über die aktivierende Wirkung von Ubichinon auf extrahierte Cytochrom-c-Reduktase ergaben einen Hinweis auf das Vorhandensein einer isoprenartigen Seitenkette und veranlassten Untersuchungen über die Biosynthese des Ubichinons.

Durch Verfütterung von $^{14}C$-signierter Mevalonsäure an Ratten konnte nun nachgewiesen werden, dass diese in beträchtlichem Ausmass in das Ubichinon eingebaut wird. Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Einbaurate von Mevalonsäure in das Ubichinon mindestens so gross ist wie bei der Cholesterin-Biosynthese.

Nach den bisherigen Kenntnissen sind höhere Tiere zum Aufbau von Benzochinonstrukturen nicht befähigt, hingegen ist bekannt, dass das Vitamin E durch Öffnung des Chromanringes in ein Benzochinonderivat umgewandelt werden kann. Wir haben deshalb schon vor der genauen Kenntnis der Struktur des Ubichinons uns die Frage vorgelegt, ob Vitamin E an seiner Biosynthese beteiligt ist. Verfütterung von Tritium-markiertem Dl-α-Tocopherolacetat zeigte jedoch eindeutig, dass dies nicht der Fall ist[6]. Es ist deshalb zu vermuten, dass die Ringkomponente des Ubichinons als solche dem tierischen Organismus zugeführt werden muss und dass die Isoprenseitenkette ganz oder teilweise durch Mevalonsäure aufgebaut wird.

Eine ausführliche Mitteilung über diese Ergebnisse wird in den Helv. chim. Acta erscheinen.

U. GLOOR und O. WISS

*Biochemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG. Basel, 19. September 1958.*

*Summary*

$^{14}C$ labelled mevalonic acid is incorporated by the rat into the ubiquinone molecule. Vitamin E, however, is no precursor of ubiquinone. It is suggested that the ring component is essential for animals and that the isoprene side chain is at least partly built up by mevalonic acid.

[3] 375th Meeting of the Biochemical Society.

[4] F. L. CRANE, Y. HATEFI, R. L. LESTER und C. WIDMER, Biochim. biophys. Acta *25*, 220 (1957).

[5] F. WEBER, U. GLOOR und O. WISS, Helv. chim. Acta *41*, 1046 (1958).

[6] Nach persönlicher Mitteilung sind J. C. JOHNSON und P. ALAUPOVIC, University of Illinois, Urbana, zum gleichen Ergebnis gekommen.

## Electrophorèse sur gel d'amidon des lipoprotéines sériques humaines

L'électrophorèse en gel d'amidon, découverte par SMITHIES[1], ajoute à la simple migration électrophorétique des protéines ou de leurs complexes, une véritable ultrafiltration à travers le gel, et sépare ces composants plasmatiques en tenant compte à la fois de leurs potentiels électrocinétiques et de leurs masses moléculaires. Cette méthode permet donc de distinguer un beaucoup plus grand nombre de composants dans un mélange de protéines que ne le permettaient les autres techniques d'électrophorèse.

L'identification des différentes fractions protéiques du sérum humain a pu être réalisée grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle[2] et a abouti à la nomenclature des fractions que nous employons. En ce qui concerne les lipoprotéines, l'existence de deux zones soudanophiles a été démontrée par SILBERMAN[3].

Dans cette note, nous allons essayer de préciser la nature des fractions soudanophiles sériques que l'on décèle après électrophorèse sur gel d'amidon.

On sait en effet qu'il existe plusieurs groupes de lipoprotéines que l'on sépare par la méthode de fractionnement de COHN, par ultracentrifugation d'après GOFMAN, par électrophorèse sur papier.

Les lipoprotéines de faible densité de GOFMAN (1063 g/cm³) correspondent aux bêta lipoprotéines sur papier[4] et aux bêta lipoprotéines de COHN[5].

Il a été démontré précédemment[6] que l'on peut précipiter sélectivement les bêta lipoprotéines par le sulfate de Dextrane en présence de Chlorure de Calcium (1 volume de sérum + 0,02 volume d'une solution de Sulfate de Dextrane à 10 p. 100 + 0,1 volume de $Cl_2CaM$). Nous avons donc comparé, après électrophorèse sur gel d'amidon, le sérum normal, le sérum sélectivement débarrassé de la totalité des bêta lipoprotéines et les bêta lipoprotéines seules.

*Protocole expérimental.* L'électrophorèse sur gel d'amidon a été réalisée dans les conditions décrites dans une précédente communication[7]. Une des conditions essentielles, lorsque l'on veut obtenir une coloration nette des fractions lipoprotéiques, est le dépôt d'une quantité suffisante de sérum.

Nos expériences ont été réalisées dans des cuves larges (234·80·6 mm de dimensions intérieures) en déposant dans un réservoir de 40·2 mm un mélange à parties égales de 0,5 ml de sérum et 0,5 ml d'amidon soluble Merck à 30% dans du tampon borate 0,025 *M*. La durée de l'électrophorèse est de *16 à 18 heures* à 140 V sous 10 mA par cuve d'amidon.

Après électrophorèse, les gels sont découpés transversalement, une des tranches obtenues est colorée par l'Amidoschwarz 10 B (en solution à 1% dans un tampon Acétate 0,1 M. Acide Acétique M à parties égales), l'autre tranche est colorée pendant 16 heures par une solution alcoolique de Noir Soudan (Noir Cérol B Kulh-

[1] O. SMITHIES, Biochem. J. *61*, 629 (1955).

[2] M. D. POULIK et O. SMITHIES, Biochem. J. *68*, 636 (1958).

[3] H. J. SILBERMANN, Bioch. Biophys. Acta, *24*, 647 (1957).

[4] F. A. PEZOLD, O. F. DE LALLA et I. W. GOFMAN, Clin. Chem. Acta *2*, 43 (1957).

[5] H. A. EDER, Amer. J. Med. *23*, 269 (1957).

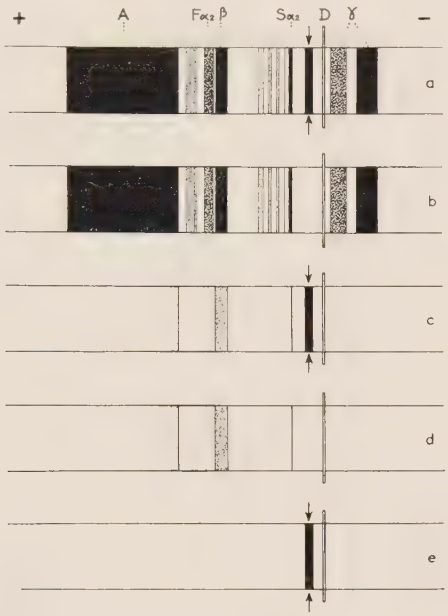
[6] M. BURSTEIN et J. SAMAILLE, Pathol. Biol. *6*, 543 (1958). – M. BURSTEIN, C. r. Acad. Sci. *243*, 527 (1956).

[7] J. M. FINE, E. WASZCZENKO, J. LOEB et J. MOULLEC, Revue d'Hématologie *12*, 698 (1957).

mann 1,2 g, $H_2O$ distillée 400 ml, Ethanol 600 ml, NaOH 2 ml).

La décoloration du fond est obtenue en laissant le lipidogramme dans de l'alcool à 60° pendant plusieurs jours (8 jours suffisent en général). Ce n'est en effet qu'au bout d'un temps de décoloration suffisamment prolongé que l'on voit apparaître certaines bandes de faible intensité.

*Résultats.* 1°. *Sérum humain total.* Celui-ci présente après coloration au Noir Soudan une zone extrêmement colorée située entre le dépôt du sérum et les $\alpha$ 2 globulines lentes (S $\alpha^2$). Cette zone est également visible sur le protéinogramme coloré à l'Amidoschwarz (Fig. 1 *a* et 1 *c*).




*a* Sérum humain normal; *b* Sérum débarrassé sélectivement des bêta-lipoprotéines; *c* Sérum humain normal; *d* Sérum débarrassé sélectivement des bêta-lipoprotéines; *e* bêta-lipoprotéines précipitées par le Sulfate de Dextrane; en présence de Chlorure de Calcium.

*a* et *b* coloration à l'Amidoschwarz; *c*, *d* et *e* coloration au Noir Soudan.

D'autres bandes colorées par le Noir Soudan sont visibles mais présentent une intensité colorée beaucoup plus faible, en particulier:

une très fine bande correspondant aux $S\alpha_2$,
une correspondant aux globulines $\beta c$,
une migrant légèrement en avant de ces globulines,

enfin, le bord de la tache des albumines est coloré, ce qui pourrait correspondre à la présence, soit d'une lipoalbumine, soit des $\alpha_1$ lipoprotéines mal séparées des albumines par l'électrophorèse en gel d'amidon.

2°. *Sérum débarrassé de bêta-lipoprotéines.* Après coloration au Noir Soudan, toutes les bandes décrites dans le sérum normal sont visibles à l'exception de la fraction lipoprotéique la plus importante située entre le point de dépôt et les globulines $\alpha_2$ lentes (Fig. 1 *d*).

Sur le protéinogramme, on note la disparition de cette bande située entre le point de dépôt et les globulines $\alpha_2$ lentes (Fig. 1 *b*).

3°. *Les bêta-lipoprotéines* se manifestent après coloration au Noir Soudan sous forme d'une fraction unique située entre le point de dépôt et les globulines $\alpha_2$ lentes (Fig. 1 *c*).

*Conclusion.* Après électrophorèse en gel d'amidon la fraction la plus importante des lipoprotéines sériques humaines migre entre le point de dépôt et les globulines $\alpha_2$ lentes.

Il s'agit de la fraction qui précipite sélectivement par le Sulfate de Dextrane en présence de Chlorure de Calcium et qui migre sur papier comme les bêta-lipoprotéines.

L'étude comparée du sérum normal et du sérum sélectivement débarrassé des lipoprotéines de faible densité permet de conclure que cette fraction est caractérisée par une bande unique visible sur le protéinogramme.

Sa faible mobilité en électrophorèse en gel d'amidon peut être expliquée par son poids moléculaire élevé.

J. M. Fine et M. Burstein

*Centre national de transfusion sanguine Paris, 20 juin 1958.*

*Summary*

The electrophoretic pattern of human serum lipoproteins after migration in starch gel is different from that obtained by other zone electrophoresis techniques. The most important component which migrates between the slot and slow alpha – 2 globulins may be identified as the component being precipitated by dextrane Sulfate and calcium chloride. The other components have the same mobility as either beta or alpha globulins.

## Changes in the Nucleic Acid Content in the Rat During Postembryonal Development

The biochemical changes taking place in the organism in the course of embryonal development are not finished with the birth of the animal. The biochemical composition of the body in the postembryonal period of development is significantly altered by the endocrine organs completing their development in this period. Among other endocrine organs, the hypophysis begins its complete functioning only after birth.

Heller[1] found in the hypophysis of mature rats 10 times more adiuretin than in the hypophysis of newborn rats, values being corrected for the body weight. The newborn rats are not able to concentrate urine in the same degree during the dehydratation as the full developed rats. Schreiber[2] followed, in newborn rats, the dependence between the evolution of postembryonal water metabolism and the postembryonal functional evolution of the eye. He observed that in the course of postembryonal evolution the procentual share of dry matter in the total weight of the organism of rats which already see, grows faster than in the course of postembryonal evolution of rats before the opening of the eyes. According to Schreiber, it is the consequence of completed evolution of neurohypophysis in the period of the accomplishment of the functional development of the eye. Dvořák[3], who studied the weight of total lipoids and of cholesterol in rats during the course of postembryonal evolution, observed that the procentual content of cholesterol and of total lipoids increases with the increasing weight quicker in the blind rats than in rats which already see. He explains his results by increased utilization of lipoids related to a new state of the hypophysis development.

[1] H. Heller, J. Physiol. *106*, 28 (1947).
[2] V. Schreiber, Časopis lékařu českých *89*, 549 (1950).
[3] Z. Dvořák, Nature *171*, 432 (1953).

In the present work, the content of desoxyribonucleic acid (DNA) and of ribonucleic acid (RNA) in albino rats was followed during the first part of postembryonal evolution. Special attention was concentrated on the period when the rats begin to see.

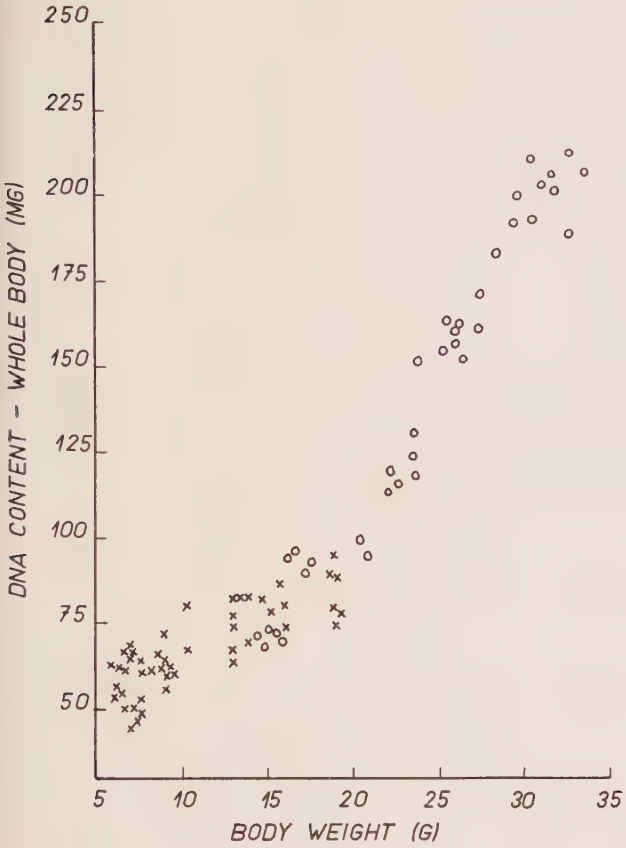



Fig. 1.—Relation of the whole-body DNA content to the body-weight of newborn rats.

× rats which could not see; ○ rats which could see.

88 rats from 19 litters were killed in days following the first day after birth until the 29th day of age. The day when the animals began to see was registered. That happened normally about the thirteenth day after birth. The whole animals were minced in a Waring Blendor. The homogenate was fractionated, using SCHNEIDER's fractionation procedure[4]. The DNA was determined with the DISCHE's reaction[5] and the RNA was determined using the modified Mejbaum's reaction[6].

It is evident from these figures that the total body amount of DNA and of RNA increases more quickly with increasing weight in rats which already see than in the rats which are still blind. In rats which had just begun to see, the trend of evolution of body's nucleic acids content was changed. From the embryonal state to maturity, the procentual content of nucleic acids in the body continually decreased. On the third day following birth, the rat contained DNA in amounts equal to 0·78%, and RNA in amounts equal to 0·73% of its body weight. The analytical data for the 14-days old, blind rats are 0·50% for DNA and 0·54% for RNA; for a mature six months old rat 0·26% for DNA and 0·41% for RNA. In rats just beginning to see, the increase of nucleic acids is more rapid than in rats before the opening of the eyes. The procentual content of the nucleic acids in the total body weight temporarily increased. This increase is most evident between the fifth and eleventh day after the rats begin to see. At this time the rat's body contains 0·62% of its weight as DNA and 0·68% of its weight as RNA on the average. From the eleventh day, the procentual content

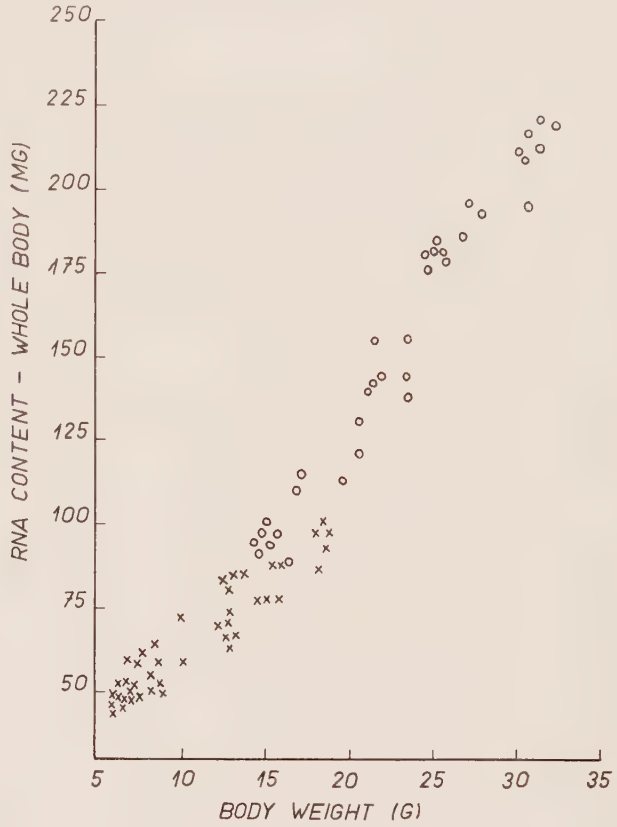



Fig. 2.—Relation of the whole-body RNA content to the body-weight of newborn rats.

× rats which could not see; ○ rats which could see.

of nucleic acids in the body begins to decrease again. This temporary interruption of the trend for procentual decrease of nucleic acids content of the body during ontogenesis, can be explained by the action of impulses from the freshly maturated visual organ on the diencephalo-pituitary system. It is well-known that the optical impulses stimulate the secretion of adrenocorticotropic and growth hormones[7] and exercice an influence on the secretion of anteriopituitary hormones[8]. As is known, the pituitary hormones affect the concentration and metabolism of nucleic acids in different organs. The team group of LI[9] and of DI STEFANO[10] found that hypophysectomy diminishes the RNA content in organs, and this effect of hypophysectomy could be reversed by the growth hormone. REID[11], who performed nucleic acids analyses of various fractions of rat liver cytoplasm, has shown characteristic changes in nucleic acids content as well as in the activity of nucleic acids metabolising enzymes[12] for every cytoplasm fraction following hypophysectomy. The more rapid increase of total DNA and RNA amount with

[4] W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chem. *161*, 293 (1945).
[5] Z. DISCHE, Mikrochemie *8*, 4 (1930).
[6] L. MASSART and J. HOSTE, Biochem. biophys. Acta *1*, 83 (1947).
[7] J. T. EAYRS, J. Endocrinol. *7*, 280 (1951).
[8] D. HOFMAN-CREDNER, Arch. int. Pharmacodyn. *91*, 241 (1952).
[9] I. GESCHWIND, C. H. LI. and H. M. EVANS, Arch. Biochem. *28*, 73 (1950).
[10] H. S. DI STEFANO, A. D. BASS, H. F. DIERMEIER, and J. TEPPERMAN, Endocrinology *51*, 386 (1952).
[11] E. REID, Nature *175*, 461 (1955).
[12] E. REID and B. M. STEVENS, Biochem. J. *68*, 367 (1958).

increasing body weight in the rats which could see in comparison with blind rats, may be related to the excretion of pituitary hormones. The findings[3] of smaller increase of lipoids and cholesterol and quicker increase of dry matter in the body of the rats which can see compared with blind rats, can be explained by the more intensive utilization of lipoids as energy donators for the synthesis of proteins stimulated by growth and other pituitary hormones, on the basis of elevated nucleic acids content. This greater increase of nucleic acids in rats beginning to see may be related to the completion of functional evolution of the eyes and to their action on the diencephalo-pituitary system. During postembryonal evolution, the influence of elevated secretion of pituitary hormones returned to normal limits and the procentual content of nucleic acids in the organism continued to decrease in agreement with the trend of ontogenetical evolution of the nucleic acids content in the rat body.

The author wishes to express his gratitude to Dr. Z. Brada for his encouragement through this work.

V. Holoubek

*Oncological Research Institute, Bratislava and Oncological Institute, Brno (Czechoslovakia), August 4, 1958.*

*Zusammenfassung*

Bei Ratten wurde der Gehalt an Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure von der Geburt bis zum 29. Lebenstag verfolgt. Mit Beginn des Sehens erhöht sich der gesamte Nukleinsäuregehalt des Organismus; vorübergehend zeigt sich auch ein prozentualer Anstieg. Diese Erhöhung des Nukleinsäuregehaltes wird als Folge der vermehrten Sekretion der durch den Lichtreiz stimulierten Hypophyse erklärt.

## Influence of Oxidative Phosphorylation Inhibitors on the Histamine Release in the Anaphylactic Reaction *in vitro*

Several recent experiments have indicated that metabolic factors are closely involved in the mechanism of histamine liberation during the anaphylactic reaction. The importance of the metabolic factors could be demonstrated by employing specific enzymatic inhibitors[1], or studying the influence of metabolites consumed during the cellular work[2].

Using the latter method, it could be demonstrated that some metabolites, such as succinate, α-keto-glutarate, acetate[3], enhance the amount of histamine released from sensitized guinea-pig lung tissue by the anaphylactic reaction *in vitro*.

Mongar and Schild[4], studying the effect of a series of enzymatic inhibitors, showed that histamine release can be inhibited by a large number of them, and that the substances which inhibited the release of histamine in anaphylaxis also inhibited oxygen consumption. Mongar and Schild concluded that the anaphylactic reaction requires a functioning cell while admitting that the experiments provided little evidence on the precise nature of the reactions involved.

It seemed important to study the influence of some potent inhibitors of the oxidative phosphorylation on the anaphylactic reaction, since we showed that there is an increase in the oxygen uptake by the tissue[5] during the anaphylactic reaction, indicating an increase in the cellular work.

For the experiments, guinea-pigs were sensitized with horse sera previously treated by potassium alum, according to the Caulfield method. Sensitization of the animals was assayed by the Schultz-Dale reaction on a piece of the ileum. The lungs of sensitized animals were sliced by hand with a sharp razor and the slices transferred to the Ringer Barron medium of the main chamber of Warburg flasks. Sodium succinate, and the enzymatic inhibitor at the required concentration, were kept in the side-bulb of the flasks and tipped into the main chamber after thermal equilibration, or incubated together with the tissue. Antigen was added 30–150 min after incubation and left a further period of 30 min for the histamine liberation. Oxygen uptake was measured every 30 min, and calculated as $mm^3$/mg dry weight/h. Histamine was assayed in the supernatant fluid by the guinea-pig ileum method and calculated in μg of histamine dihydrochloride by g wet weight. As inhibitors of the oxidative phosphorylation, 2,4-dinitrophenol, pentachlorophenol, and sodium azide were investigated and the results are given in Table I.

All the three substances assayed caused an effective inhibition of the histamine release. 2,4-dinitrophenol at the concentration of $10^{-4}$ *M*, known as uncoupling phosphorylation from cellular oxidation[6], almost completely inhibited the liberation of histamine, leaving the oxygen uptake normal or even increased. Pentachlorophenol[7] and sodium azide[8] which are known to act like dinitrophenol, prevented significantly the histamine release by the antigen. Decrease in the $Q_{O_2}$ observed in the experiments with the azide cannot explain the lowering in the histamine released. Using low tensions of oxygen (10% $O^2$ and 90 $N^2$), a decrease of the $Q_{O_2}$ of around 50% can be obtained without decrease in the histamine released[9].

In another series of experiments, the influence of 2,4-dinitrophenol on the histamine released by the lungs was investigated in a medium containing succinate and α-ketoglutarate. The results of Table II show the strong inhibitory action of 2,4-dinitrophenol, both on the additional histamine released by the effect of substrates, and by the antigen alone.

These experiments give suggestive evidence that the histamine released during the anaphylactic reaction needs energy-rich phosphorylated compounds. The experiments with succinate and other metabolites of the Krebs cycle can be explained by supposing that the oxidation of these substrates led to an increase in available phosphorylated compounds[10].

H. Moussatché and A. Prouvost-Danon*

*Division of Physiology, Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (Brazil), June 30, 1958.*

[1] J. L. Parrot, C. R. Soc. Biol., Paris *136*, 361 (1942). – J. L. Mongar and H. O. Schild, Nature *176*, 163 (1955).

[2] H. Moussatché and A. Prouvost-Danon, Naturwiss. *44*, 330 (1957); Arch. Biochem. Biophys., in press (1958).

[3] H. Moussatché and A. Prouvost-Danon, An. Acad. bras. Cienc. *29*, 30 (1957).

[4] J. L. Mongar and H. O. Schild, J. Physiol. *135*, 301 (1957).

[5] H. Moussatché and A. Prouvost-Danon, An. Acad. bras. Cienc. *28*, 23 (1956).

[6] R. J. Cross, J. V. Taggart, G. A. Covo, and D. E. Groen, J. biol. Chem. *177*, 655 (1949).

[7] E. Weinbach, J. biol. Chem. *210*, 545 (1954).

[8] S. Spiegelman, M. D. Kamen, and S. Sussman, Arch. Biochem. Biophys. *18*, 409 (1948).

[9] H. Moussatché and A. Prouvost-Danon, Unpublished observations.

[10] S. P. Colowick, M. S. Welch, and C. F. Cori, J. biol. Chem. *133*, 359 (1940). – S. Ochoa, J. biol. Chem. *155*, 87 (1944).

* Fellow from the Conselho Nacional de Pesquisas.

*Table I*

Action of some inhibitors of the oxidative phosphorylation on the oxygen uptake and histamine release by antigen from sensitized guinea-pig lung slices

| Inhibitor | | $Q_{O_2}$** | Histamine released (μg/g wet weight) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Concentration | Incub. time* min | | Without antigen (a) | With antigen (b) | (b–a) |
| 0 | 90 | 5·84 ± 0·29 (4) | 3·3 (1) | 15·8 ± 1·4 (4) + + | 12·5 |
| 2,4-dinitrophenol $10^{-4}$ *M* | 90 | 5·89 ± 0·31 (4) | 3·4 (1) | 5·2 ± 0·35 (4) + + | 1·8 + + |
| 0 | 150 | 6·92 ± 0·20 (4) | 2·5 (1) | 9·4 ± 0·47 (4) + + | 6·9 |
| 2,4-dinitrophenol $10^{-4}$ *M* | 150 | 6·85 ± 0·34 (4) | 3·1 (1) | 5·1 ± 1·0 (4) + + | 2·0 + + |
| 0 | 30 | 7·62 ± 0·40 (2) | 1·8 (1) | 10·2 ± 1·4 (2) | 8·4 |
| 2,4-dinitrophenol $10^{-4}$ *M* | 30 | 9·00 ± 0·03 (2) | 1·9 (1) | 2·8 ± 0·5 (2) + + | 0·9 + + |
| 0 | 60 | 4·54 ± 0·15 (4) | 2·5 (1) | 3·9 ± 0·17 (4) | 1·4 |
| Pentachlorophenol $10^{-5}$ *M* | 60 | 4·39 ± 0·19 (4) | 2·4 (1) | 3·4 ± 0·22 (4) + | 1·0 + |
| 0 | 60 | 6·95 ± 0·34 (4) | 0·9 (1) | 4·5 ± 0·13 (4) | 3·6 |
| Pentachlorophenol $2{\cdot}5 \times 10^{-5}$ *M* | 60 | 6·40 ± 0·45 (4) | 1·0 (1) | 1·1 ± 0·13 (4) + + | 0·1 + + |
| 0 | 60 | 5·75 ± 0·31 (4) | 2·2 (1) | 17·0 ± 1·65 (4) | 14·8 |
| Pentachlorophenol $5 \times 10^{-5}$ *M* | 60 | 2·98 ± 0·20 (4) | 3·0 (1) | 3·4 ± 0·18 (4) | 0·4 + + |
| 0 | 120 | 4·18 ± 0·13 (4) | 2·8 (1) | 9·0 ± 0·67 (4) | 6·2 |
| Azide $1 \times 10^{-3}$ *M* | 120 | 3·25 ± 0·28 (4) | 2·8 (1) | 5·2 ± 0·26 (4) + + | 2·4 + + |
| 0 | 120 | 3·97 ± 0·16 (4) | 2·0 (1) | 16·9 ± 0·5 (4) | 14·9 |
| Azide $2{\cdot}5 \times 10^{-3}$ *M* | 120 | 2·76 ± 0·04 (4) | 2·4 (1) | 4·1 ± 0·2 (4) + + | 1·7 + + |
| 0 | 120 | 5·42 ± 0·23 (4) | 3·1 (1) | 20·6 ± 1·1 (4) | 17·5 |
| Azide $5 \times 10^{-3}$ *M* | 120 | 1·96 ± 0·16 (4) | 4·3 (1) | 4·6 ± 0·2 (4) + + | 0·3 + + |

* Incubation time before antigen addition.
** Figures taken the 30 min following antigen addition (in parenthesis number of Warburg flasks used).
\+ '*t*' test between the means: $P < 0{\cdot}05$.
\+ + '*t*' test between the means: $P < 0{\cdot}01$.

*Table II*

Inhibition by 2,4-dinitrophenol of the effect of succinate and α-keto-glutarate on the histamine released during the anaphylactic reaction *in vitro*

| 2,4-dinitrophenol, succinate, and α-keto-glutarate | | $Q_{O_2}$** | Histamine released (μg/g wet weight) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Concentration | Incub. time* (min) | | Without antigen (a) | With antigen (b) | (b–a) |
| 0 | 120 | 5·31 ± 0·10 (3) | 2·4 (1) | 5·2 ± 0·17 (3) | 2·8 |
| Succinate $4 \times 10^{-2}$ *M* | 120 | 9·81 ± 0·27 (3) | 2·8 (1) | 7·2 ± 0·65 (3) + + | 4·4 + + |
| Succinate $4 \times 10^{-2}$ *M* + DNP $10^{-4}$ *M* | 120 | 9·66 ± 0·79 (3) | 3·8 (1) | 3·6 ± 0·36 (3) + + | 0·0 + + |
| 0 | 120 | 4·10 ± 0·21 (3) | 3·0 (1) | 14·3 ± 0·95 (3) | 11·3 |
| Succinate $4 \times 10^{-2}$ *M* | 120 | 10·39 ± 0·83 (3) | 3·0 (1) | 21·9 ± 0·47 (3) + + | 18·9 + + |
| Succinate $4 \times 10^{-2}$ *M* + DNP $10^{-4}$ *M* | 120 | 10·40 ± 0·13 (3) | 3·1 (1) | 3·5 ± 0·12 (3) + + | 0·4 + + |
| α-keto-glutarate $10^{-2}$ *M* | 30 | 7·69 ± 1·10 (2) | 0·0 (1) | 6·2 ± 0·7 (2) | 6·2 |
| α-keto-glutarate $10^{-2}$ *M* + DNP $10^{-4}$ *M* | 30 | 9·95 ± 0·27 (3) | 0·0 (1) | 1·0 (3) + + | < 1·0 + + |

* Incubation time before antigen addition.
** Figures taken the 30 min following antigen addition (in parenthesis number of Warburg flasks used).
\+ '*t*' test between the means: $P < 0{\cdot}05$.
\+ + '*t*' test between the means: $P < 0{\cdot}01$.

*Résumé*

Des expériences ont été faites pour étudier l'influence des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative sur la libération d'histamine pendant la réaction anaphylactique.

Une inhibition de la libération d'histamine a été observée, suggérant que des composés phosphorylés riches en énergie sont liés au mécanisme de libération.

## Sur les variations stressogènes quantitatives de la sérotonine dans le cerveau

L'étude du rôle de la sérotonine dans le syndrome d'adaptation présente un intérêt particulier. Au cours de nos recherches sur l'influence de la réserpine sur le système neuro-endocrine des lièvres soumis à l'émotion, nous avons constaté une réponse stressogène notable des cellules neuro-ganglionnaires de la région hypothalamique [1–3]. Ceci nous a suggéré l'idée d'une étude sur les variations quantitatives de la sérotonine au niveau du cerveau sous l'effet de la frayeur.

[1] R. Miline, P. Štern et E. Šerstnev, C. R. Assoc. Anatom. *95*, 579 (1957).

[2] R. Miline, P. Štern, E. Šerstnev et M. Muhibić, in *Psychotropic Drugs* (Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1957), p. 448.

[3] P. Štern, R. Miline, E. Šerstnev et A. Mihajlov, *L'effet de la réserpine sur l'hypothalamus du lièvre*, in Pathologia Diencephalica, symposium Internationale Milano (Springer 1958).

Les lièvres, animaux sauvages, constituent le matériel de choix pour cette étude. Un groupe de ces animaux a été sacrifié aussitôt après la capture. Ce groupe était le groupe témoin. Un deuxième groupe a été transporté au laboratoire et soumis à la frayeur causée par la présence d'un chien de chasse pendant 2 h par jour. Les quantités de sérotonine, évaluées comme sérotonine base, sur 1 g de substance cérébrale et selon la méthode d'Amin *et al.*[4], ont été déterminées chez les lièvres sacrifiés après 3, 7, 10 et 14 jours d'expérience. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau.

Quantités de sérotonine cérébrale chez des lièvres soumis à l'influence de la peur et exprimées comme sérotonine base

| Lièvres | Nombre d'animaux examinés | Quantités de sérotonine en $\gamma$ |
|---|---|---|
| Témoins . . . . . | 5 | 0,075 ± 0,0061 |
| 3 jours sous la peur . . . | 3 | 0,096 ± 0,022 |
| 7 jours sous la peur . . . | 12 | 0,102 ± 0,011 |
| 10 jours sous la peur . . . | 9 | 0,040 ± 0,015 |
| 14 jours sous la peur . . . | 11 | 0,059 ± 0,0098 |

Ces résultats donnent une preuve que la quantité de sérotonine cérébrale augmente sous l'influence de la frayeur en atteignant son maximum le septième jour, puis s'abaisse au-dessous de la normale, pour remonter, mais sans jamais réatteindre cette normale, à la fin de l'expérience. Cette augmentation initiale de la quantité de sérotonine cérébrale marche de pair avec une augmentation de l'hyperactivité thyroïdienne (effet thyréotrope de la peur[1,5], sans une intervention notable histo-physiologique du cortex surrénal[2].

Les données acquises démontrent que la sérotonine est sujette à des variations quantitatives notables au cours du stress émotionnel. Elles présentent une preuve de la réaction stressogène d'une substance d'origine cérébrale hautement engagée dans le mécanisme du syndrome d'adaptation.

R. Miline, P. Štern et S. Huković

*Institut d'Histologie et d'Embryologie et Institut de Pharmacologie et de Toxicologie de la Faculté de Médecine, Sarajevo (Yougoslavie), le 18 juin 1958.*

*Zusammenfassung*

Das zerebrale Serotonin unterliegt im Verlaufe eines emotionellen Stress bedeutenden quantitativen Veränderungen. Bei Wildhasen, welche 14 Tage lang Schreckzeichen ausgesetzt waren, vermehrte sich die Menge des Serotonins und erreichte ihr Maximum am 7. Tag. Nachher sinkt die Menge unter den Normalwert, um am Ende der zweiten Woche wieder anzusteigen, wobei sie unter dem Normalwert bleibt.

[4] A. H. Amin, T. B. B. Crawford et J. H. Gaddum, J. Physiol. *126*, 596 (1954).

[5] P. Štern, R. Miline et M. Šćepović, Schweiz. med. Wschr. *1956*, 415.

## In Krebszellen induzierbare anoxygene Energiewirkung durch $O_2$-freie Dekokte aus Krebsgeschwülsten

In Auswirkung anaerober Passagenzüchtung anabiotisch gewordene Kulturhefen[1] gären im Zustand der Zytostase ebenso kräftig wie im Normalzustand[2], trotzdem sind sie aber nicht mehr zu hervortretenden synthetischen Leistungen fähig[3], was schon allein aus der Sistierung ihres Wachstums hervorgeht. Nur durch ausreichende Belüftung gelingt es, die Anabiosezellen wieder zur Proliferation zu bringen[4]. Von einer zufälligen Beobachtung ausgehend, stellten wir nun letzthin fest[5], dass es – an Stelle von Sauerstoff – auch durch Zusatz von $O_2$-freien Dekokten aus tierischen und menschlichen Krebsgeschwülsten möglich ist, die anoxybiotisch hervorgerufene Zytostase unter anaeroben Bedingungen aufzuheben und die Zellvermehrung weitgehend zu reaktivieren. Es handelt sich hierbei um einen bisher unbekannten anoxygenen Energieprozess, an dessen Zustandekommen, wie wir nachweisen konnten[6], elektronenübertragende Cofaktoren (Elektronenakzeptoren) beteiligt sind. Zu diesen gehört jedoch *nicht* DPN[7], wie die anabiotischen Testungen ergeben haben, so dass demzufolge Gärung und Glykolyse mit dem obigen Prozess der anoxygenen Energiebildung nicht identisch sind[8].

Nachdem es sich gezeigt hatte, dass in sämtlichen von uns untersuchten malignen Tumoren, tierischen wie menschlichen, energiefreisetzende Cofaktoren nachweisbar sind[9], war die Frage von nächstliegendem Interesse, ob sich auch *Krebszellen* in ähnlicher Weise wie Hefezellen reaktivieren lassen, wenn sie im anoxybiotischen Medium der Wirkung von $O_2$-freiem Krebskochsaft ausgesetzt werden. Erfahrungsgemäss ist es in der Gewebezüchtung nicht erreichbar, was wir kürzlich unter energetischem Aspekt kritisch herausstellten[10], Krebsgewebe – trotz seiner spezifisch glykolytischen Potenz[11] – anaerob *in vitro* weiterzuzüchten oder für längere Zeit am Leben zu erhalten[12].

Um nun eine Entscheidung darüber herbeizuführen, ob Krebszellen in der Anoxybiose – mit und ohne Zusatz von Krebskochsaft[13] – ein unterschiedliches Verhalten zutage

[1] F. Windisch, H. Haehn und W. Heumann, Arch. Geschwulstforsch. *6*, 64 (1953).

[2] F. Windisch, W. Heumann und Chr. Goslich, Biol. Zbl. *74*, 646 (1955).

[3] F. Windisch, W. Heumann und Chr. Goslich, Z. Naturforsch. *8b*, 305 (1953).

[4] F. Windisch, W. Heumann und Chr. Goslich, Z. Naturforsch. *8b*, 310 (1953).

[5] F. Windisch, H. Haehn, W. Heumann, W. Nordheim und B. Kroll, Naturwiss. *44*, 95 (1957). – F. Windisch, W. Heumann und W. Nordheim, Z. Naturforsch. *12b*, 348 (1957).

[6] F. Windisch, H. Haehn, W. Nordheim und W. Heumann, Z. Naturforsch. (im Druck).

[7] F. Windisch, U. Gerhardt und W. Nordheim, Naturwiss. (im Druck).

[8] F. Windisch, *Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry*, Tokio 1957 (erscheint Juni 1958).

[9] F. Windisch, W. Nordheim und W. Heumann, Z. Krebsforsch. (im Druck).

[10] F. Windisch, H. Haehn, W. Heumann, W. Nordheim und H. Kerner, Naturwiss. (im Druck).

[11] D. Burk, Addendum zu O. Warburg, Science *123*, 309 (1956).

[12] O. Warburg, F. Wind und E. Negelein, Klin. Wschr. *5*, 829 (1926).

[13] Dekokte aus normalen Embryonal-, Organ- und Drüsengeweben sind ebenfalls wirksam, *nicht* dagegen aus Muskelgeweben (F. Windisch, Vortrag Berliner physiol. Ges. 10. 6. 1958, Ref.: Klin. Wschr.). – Das Spezifische der durch Zellkochsäfte auslösbaren an-

treten lassen, gingen wir zu vergleichenden Versuchen über, die wir in Carrelschalen mit zusätzlicher Begasungseinrichtung vornahmen[14]. Als malignes Testmaterial verwendeten wir Jensen-Sarkom der Ratte, das 11 Tage nach der Beimpfung exstirpiert und in Form von dünnen Gewebestückchen (etwa 1 mm²) zunächst 5 Tage lang in üblicher Weise auf festem Plasmaboden angezüchtet wurde. Vom 6. bis 9. Tag wurde dann mit Reinststickstoff, dem etwa 5% $O_2$-freies $CO_2$ beigemischt waren, kontinuierlich begast. Im Verlauf der anaeroben Versuchsperiode erfolgte die Fütterung (ebenfalls streng anaerob) in Versuchsreihe I weiterhin mit normalem Nährsubstrat (2 Teile Tyrodelösung, 2 Teile Pferdeserum, 1 Teil Hühnerembryonalextrakt), in Versuchsreihe II dagegen mit Krebskochsaft-Nährlösung, die sich von der normalen lediglich dadurch unterscheidet, dass die Tyrodesalze hierbei nicht in Wasser, sondern in der gleichen Menge Krebskochsaft gelöst werden.

Am 9. Versuchstag, unmittelbar nach Abschluss der Begasung, wurden die Kulturen beider Versuchsreihen aus den Carrelschalen herausgenommen. Die erste Hälfte der Explantate prüften wir auf Lebensfähigkeit mit Trypanblau (Verdünnung 1:5000), die andere Hälfte präparierten wir zwecks Untersuchung auf Mitosen (Fixierung mit Kaliumbichromat-Formalinlösung; 3wöchige Einbettung in Celloidin-Paraffin). Alsdann wurden die angefertigten Gewebeschnitte zur Mitosen-Bestimmung einmal mit Hämatoxylin-Eosin[15] angefärbt und zweitens der Feulgen-Reaktion unterzogen.

Auf Grund der Trypanblau-Färbung und des Mitosen-Nachweises gelangten wir zu folgendem Untersuchungsergebnis:

Versuchsreihe I: intensive Blaufärbung der peripheren Zellen, keine Mitosen;

Versuchsreihe II: keine Färbung der peripheren Zellen, Mitosen in mehreren Bezirken.

Der Ausfall obiger Vergleichsversuche gibt eindeutig zu erkennen, dass – unter strikter Fernhaltung von Sauerstoff – die mit Krebskochsaft behandelten Krebszellen resistenter sind als die unbehandelten. Unter dem Einfluss der in den Krebsdekokten von uns nachgewiesenen energiefreisetzenden Cofaktoren bleibt offensichtlich die Lebensfähigkeit der Krebszellen und ihr Vermögen zur Mitosenbildung länger erhalten als ohne Eingreifen dieser Akzessorien. Das vorliegende positive Ergebnis veranlasste uns, zu Untersuchungen an Einzell-Kulturen überzugehen und den Transplantationstest einzubeziehen.

F. Windisch, H. Kerner und W. Schacht

*Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin und Universitäts-Hautklinik der Charité, Berlin, 17. Mai 1958.*

*Summary*

Cancer cells treated in anaerobic tissue-culture with tumour-decocts keep their vitality and their ability of building mitosis longer than untreated ones. From this it follows that electrontransferring cofactors found in tumour-decocts excite an anoxygenic energy-effect also on cancer tissues.

oxygenen Reaktivierung im Anabiosestadium besteht darin, dass sie nur bei Gärungszellen, nicht aber bei Atmungszellen ($Q_{O_2}$: $Q_{O_2} \approx 1$) eintritt.

[14] F. Windisch und W. Heumann sowie H. Kriegel und A. Graffi (Gemeinschaftsarbeit), Z. Naturforsch. *8b*, 673 (1953).

[15] Hämatoxylinlösung nach Delafield und Romeis, *Mikroskopische Technik* (Leibniz-Verlag, München 1948), und zwar § 669.

## Effects of Acute Hypochloremia on Glomerular Filtration Rate and Electrolyte Excretion in the Dog

Acute hypochloremia was induced in dogs by the use of an artificial kidney[1]. During a priming stage, plasma chloride concentration was acutely decreased by dialyzing the blood against an isotonic chloride-free rinsing fluid where NaCl was replaced by $NaHCO_3$ or $NaNO_3$ (Table I). Subsequently, a steady hypochloremic state was maintained by a second bath containing electrolytes in concentrations similar to those of the dog plasma at the end of the priming stage. With this method it was possible to study the effects of hypochloremia without hyponatremia and with or without alkalosis on the glomerular filtration and electrolyte excretion rates (Fig. 1 and 2).

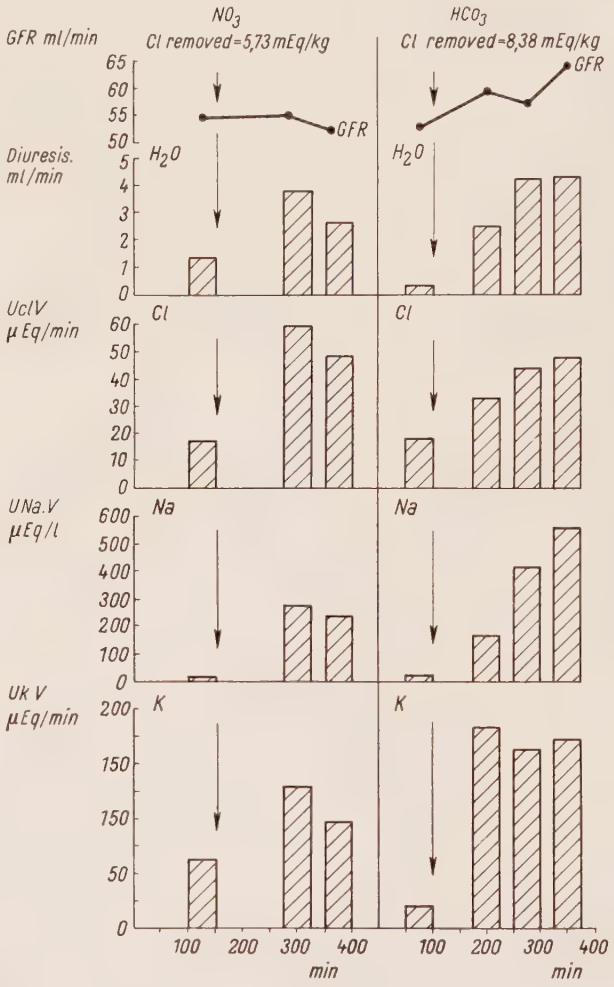



Fig. 1.—Glomerular filtration rate and electrolyte excretion changes observed in same experiments as in Figure 2.

3 experiments were performed with $NaNO_3$ and 6 with $NaHCO_3$. The following results were obtained during 12 standard 10 min-clearance periods for each experiment.

(1) *Glomerular Filtration Rate*[2]. Hypochloremia, with

[1] We are much indebted to Dr. R. P. Herwick, from Baxter Laboratories, Morton Grove, Ill. (U.S.A.), for supplying the Kolff's coil kidney units used in these experiments.

[2] The experiments involving a drop of blood pressure, as is often observed during hemodialysis in dogs, have been omitted from our results.

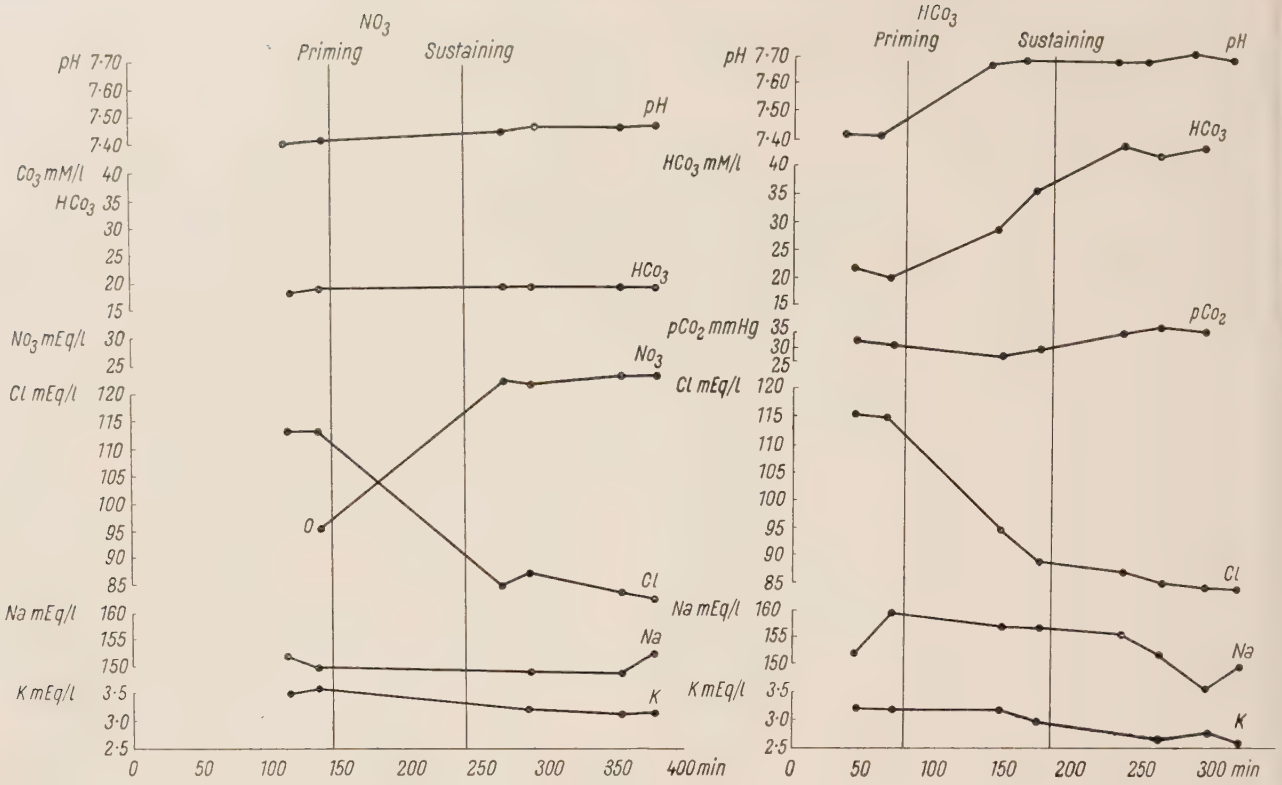



Fig. 2.—Blood changes during $NO_3$ (left) and $HCO_3$ (right) induced hypochloremia. The vertical lines indicate the beginning of each type of bathes used.

or without alkalosis, does not lower the glomerular filtration rate (Table II).

(2) *Sodium Excretion.* Although there was no significant change in the sodium glomerular filtered load during these experiments, the excretion of sodium increased markedly in both types of hypochloremia.

The ratio of excreted Na/filtered Na rose from a mean control value of 0·2 up to 4·5% when the chloremia was decreased from 117 to 84 mEq/l.

*Table I*
Composition of Bathing Fluids

| Bathing Fluids | Milliequivalents per l | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cl | $NO_3$ | $HCO_3$ | Na | K | Ca | Mg |
| Normal . . . . | 120 | — | 30 | 142 | 4 | 2·5 | 1·5 |
| $NO_3$ Priming | 8 | 115 | 30 | 145 | 4 | 2·5 | 1·5 |
| Sustaining | 80 | 143 | 30 | 145 | 4 | 2·5 | 1·5 |
| $HCO_3$ Priming . | 8 | — | 145 | 145 | 4 | 2·5 | 1·5 |
| Sustaining | 80 | — | 73 | 145 | 4 | 2·5 | 1·5 |

(3) *Potassium Excretion.* Potassium excretion was also raised during both types of experiments. In $NO_3$-induced hypochloremia, the ratio excreted K/filtered K rose from 18 up to 65% as the plasma chloride concentration fell from 118 to 84 mEq/l. Potassium excretion was much more increased in hypochloremic alkalosis where the excreted K/filtered K ratio increased proportionally to the blood pH (Fig. 3), as has been previously shown by Franglen *et al.*[3].

[3] G. T. Franglen, E. McGarry, and A. G. Spencer, J. Physiol. *121*, 35 (1953).

(4) *Chloride Excretion.* Despite the marked reduction of the chloride glomerular filtered load, chloride excretion was usually increased in both types of hypochloremia. The ratio of excreted Cl/filtered Cl rose from 0·2 up to 1·4% in the nitrate experiments and from 0·7 to 1·0% in hypochloremic alkalosis.

(5) *Bicarbonate Excretion.* Although bicarbonate excretion was regularly increased in hypochloremic alkalosis, it never reached the values observed during 4 control experiments where a 6% $NaHCO_3$ solution was infused in dogs submitted to hemodialysis against a normally balanced bathing fluid. In these latter experiments, not involving hypochloremia, the usual threshold value for bicarbonate was obtained: from 26 to 28 *mM* of bicar-

*Table II*
Effect of Hypochloremia on Glomerular Filtration Rate

| Experiment No. | Plasma chloride mEq/l | | Glomerular Filtration Rate ml/min** | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | Hypochloremia | Control | Hypochloremia |
| 1* | 118 | 89 | 54·6 | 55·5 |
| 2* | 121 | 76 | 90·8 | 89·8 |
| 3* | 115 | 87 | 71·2 | 68·8 |
| 4 | 116 | 92 | 76·2 | 75·5 |
| 5 | 116 | 92 | 53·1 | 60·4 |
| 6 | 118 | 76 | 64·1 | 68·0 |
| 7 | 118 | 80 | 43·4 | 59·0 |
| 8 | 115 | 85 | 69·9 | 79·0 |
| 9 | 116 | 79 | 81·3 | 95·0 |
| Means | 117 | 84 | 67·2 | 72·3 |

* $NO_3$-induced hypochloremia.
** Each value represents the mean of three successive creatinine clearance periods.

bonate reabsorbed per liter of glomerular filtrate[4]. In contrast to this, our dogs in hypochloremic alkalosis showed bicarbonate threshold values rising parallel to the

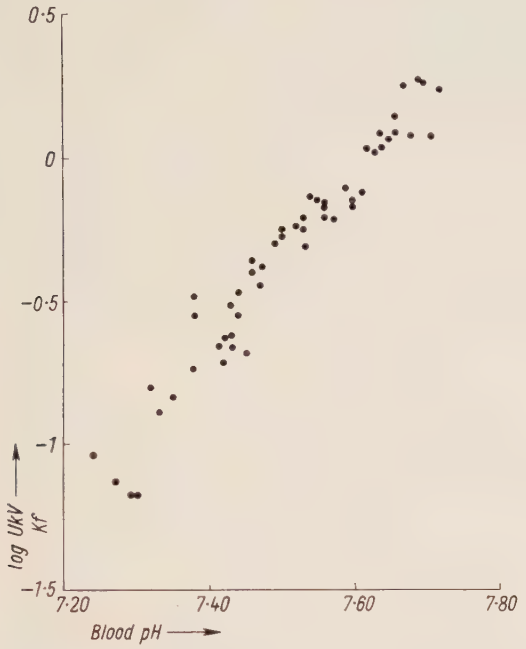



Fig. 3.—The ratio of excreted K/filtered $K$ in relation to blood pH in hypochloremic alkalosis.

plasma bicarbonate concentration (Fig. 4), such as has been observed by Relman *et al.*[5], Brazeau and Gilman[6], and Dorman and Sullivan[7] in respiratory acidosis and by Roberts *et al.*[8] in potassium depletion. A similar increase in bicarbonate reabsorption was observed when a 6% $NaHCO_3$ solution was infused during $NO_3$-induced hypochloremia.

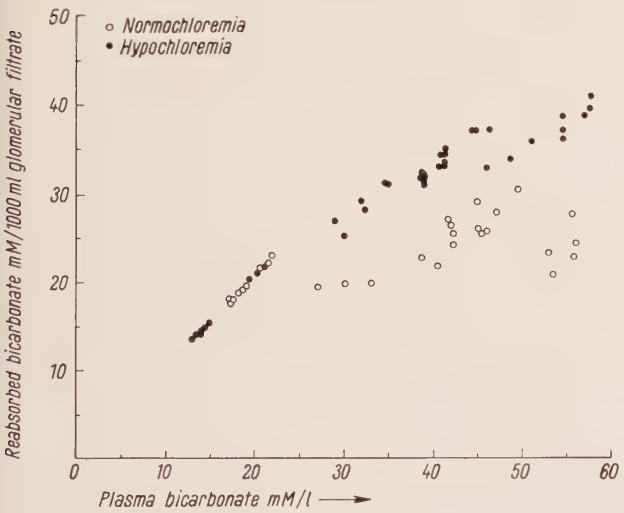



Fig. 4.—Bicarbonate reabsorption during hypochloremic alkalosis (black circles) and during 6% $NaHCO_3$ infusion (open circles). The values under 25 mEq/l represent data obtained during the control periods.

These findings demonstrate a definite competition between bicarbonate and chloride in tubular reabsorption. This phenonemon was first described by Pitts and Lotspeich[4] and more recently by Hilton *et al.*[9] who studied the effect of increased plasma chloride concentration on bicarbonate reabsorption.

Ch. Toussaint, M. Telerman, and P. Vereerstraeten

*Laboratoire de Médecine expérimentale, Université Libre de Bruxelles et Fondation Médicale Reine Elisabeth, Bruxelles (Belgium), June 30, 1958.*

*Résumé*

La chlorémie du chien a été abaissée à l'aide d'un rein artificiel en utilisant des liquides de dialyse où une certaine quantité de chlore était remplacée par du bicarbonate ou du nitrate. Dans ces conditions, l'hypochlorémie s'accompagne:

1° d'une conservation de la filtration glomérulaire;

2° d'un accroissement de l'excrétion du sodium, du potassium et du chlore;

3° d'une élévation du seuil d'excrétion du bicarbonate.

[4] R. F. Pitts and W. D. Lotspeich, Amer. J. Physiol. *147*, 481 (1946).

[5] A. S. Relman, B. Etsten, and W. B. Schwartz, J. clin. Invest. *32*, 972 (1953).

[6] P. Brazeau and A. Gilman, Fed. Proc. *12*, 19 (1953).

[7] P. J. Dorman and W. J. Sullivan, Fed. Proc. *12*, 34 (1953).

[8] K. E. Roberts, H. T. Randall, H. L. Sanders, and M. Hood, J. clin. Invest. *34*, 666 (1955).

[9] J. G. Hilton, N. E. Capeci, G. T. Kiss, O. R. Kruesi, V. V. Glaviano, and R. Wégria, J. clin. Invest. *35*, 481 (1956).

## On the Participation of the Zona Glomerulosa on the Adrenal Response to Stress

The adrenal glomerulosa is considered to be the site of mineralocorticoid production, as was recently proved by Hartroft and Eisenstein[1]. However, the physiological mechanism by which its function is regulated still remains obscure. The conception of the high independence of glomerulosa on pituitary control[2] disagrees with the observation of glomerulosa reaction taking place only in the presence of hypophysis[3] or the glomerulosa reaction on ACTH in hypophysectomized animals[4]. The experimental results, here presented, contribute to the closer elucidation of this problem.

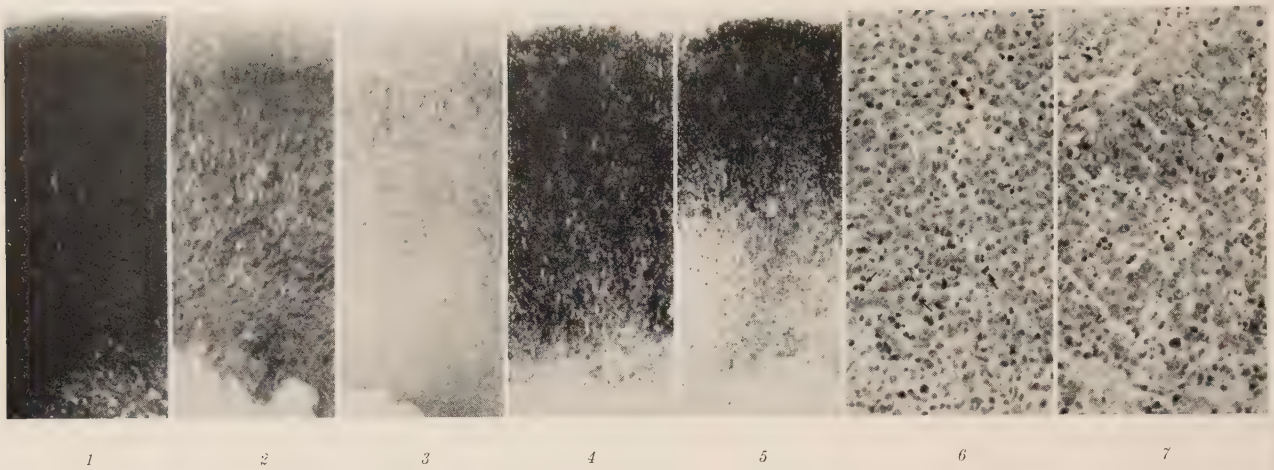
White Wistar rats, males about 5 months old and 200 to 250 g in weight, were the object. The rats were stressed by a single intramuscular injection of 4% formaldehyde in the quantity of 0·3 ml/100 g, and were killed at intervals of 1 h and 3 h after the injection. The adrenals were fixed by 4% formaldehyde with 1% $CaCl_2$. The lipids of

[1] P. M. Hartroft and A. B. Eisenstein, Endocrinology *60*, 641 (1957).

[2] H. W. Deane and R. O. Greep, Amer. J. Anat. *79*, 117 (1946). – H. W. Deane, J. H. Shaw, and R. O. Greep, Endocrinology *43*, 133 (1948).– E. Knobil, A. Morse, and R. O. Greep, Anat. Rec. *121*, 324 (1955).

[3] K. Kovács, É. Horváth, B. M. Kovács, G. S. Kovács, and G. Petri, Arch. int. Pharmacodyn. *108*, 170 (1956). – K. Kovács, B. M. Kovács, G. S. Kovács, and G. Petri, Naturwissenschaften *44*, 241 (1957). – A. Nagy, A. Olah, and S. Karady, Nature *180*, 1481 (1957).

[4] B. C. Wexler, A. P. Rinfret, A. C. Griffin, and H. L. Richardson, Endocrinology *56*, 120 (1955). – J. D. Lever, Endocrinology *58*, 163 (1956).



1 2 3 4 5 6 7

Fig. 1–3.—Series A. The adrenal cortex of the non-stressed rat (Fig. 1) and 1 h (Fig. 2) and 3 h (Fig. 3) after the formaldehyde injection. The progressive lipid depletion from the fascicular as well as glomerular layer can be observed. Sudan black B. × 80.

Fig. 4–5.—Series B. The adrenal cortex of the non-stressed rat (Fig.4) and 3 h after the formaldehyde injection (Fig. 5). Zona fasciculata of non-stressed rat of this series contained less lipids than those of series A. In the third hour after the formaldehyde injection, the lipids disappeared from deeper layers of the fasciculata; zona glomerulosa remains non-influenced. Sudan black B. × 80.

Fig. 6–7.—The centre of spleen lymphatic nodule of the rat of series A (Fig. 6) and series B (Fig. 7) in the third hour after the beginning of stress. The swelling of lymphoid tissue and a marked lymphocyte disintegration took place only in the nodules of series B (Fig. 7). The nodules of series A were moderately penetrated by erythrocytes (↑). Azur II-Eosin. × 295.

the frozen sections (15 μ) were stained with Sudan black B and with Oil red O. Moreover, the number of leucocytes, their differential count, and the absolute number of eosinophils were determined. The spleen and the thymus were made up by histological technique. Paraffin sections (5 μ) of these organs were stained with Azur II-Eosin[5].

Series A, used on July 11th, containing 15 rats, was divided into trios injected by formaldehyde successively between 9 a.m. and 5 p.m. One rat of each trio was the non-injected control. In series B, treated on October 8th, the formaldehyde injection in 10 rats was carried out at 9 a.m. Twelve control rats were killed, partly at the beginning of this experiment, partly together with stressed rats.

Series A: As early as 1 h after formaldehyde injection, the lipids of the fasciculata as well as of the glomerulosa became markedly reduced (Fig. 2). The depletion of lipids affected the cell districts of fasciculata between which there could be found single cells or groups of cells containing the full amount of lipid droplets in their cytoplasm. In the glomerulosa, the lipids gradually disappeared, especially from the cytoplasm of subcapsular cells. 3 h after formaldehyde injection, the lipid discharge in the adrenal cortex was still more advanced (Fig. 3). Cells of the fasciculata preserving the original range of lipid droplets were scarce. In the glomerulosa the Sudan-positive material of subcapsularly localized cells completely disappeared; however, in deeper layers of this zone, some was preserved in small amounts here and there.

Series B: The adrenals of non-stressed rats of this series differed from those of series A by less lipid content in the fasciculata (Fig. 4). The lipid depletion involving exclusively the fascicular layer was discernible as late as 3 h after stress stimulus (Fig. 5). It is noteworthy that the glomerular layer remains unaffected at the same time. Furthermore, in distinction to the entirely depleted adrenal cortex in the series A, the disappearing of lipids was carried out only in the deeper layers of fasciculata. Therefore the zona fasciculata of the stressed rats of series B became relatively more abundant in lipids than those of series A at corresponding intervals.

Regarding the structure of lipid inclusions, it is worthy of note that in adrenals of non-stressed, as well as of stressed rats of series A, the lipids were deposited in cells both of glomerulosa and fasciculata in the form of very fine droplets; on the other hand, in series B in the form of coarse vacuoles.

Both series of rats differed in their initial level of leucocytes which amounted to 12,900 ± 4,205 in series A and to 7,750 ± 1,600 in series B. The difference was statistically significant, $p < 0{\cdot}01$. Similarly the difference in the initial lymphocyte level amounting to 10,404 ± 3,252 in series A, whereas only to 5,717 ± 1,845 in series B, was statistically significant, $p < 0{\cdot}002$. The differences in values of neutrophils and eosinophils were not significant. Up to the third hour after formaldehyde injection, the lowering of lymphocytes and eosinophils, and the disintegration of lymphocytes in the thymus cortex was noticed in both series without any apparent difference. Different results were gained when qualifying the stress changes in the light centres of the lymphatic nodules of the spleens. In series A, the disintegration of lymphocytes was nearly absent (Fig. 6). On the other hand, in series B, swelling of the nodular lymphoid tissue, lacking in series A, and marked disintegration of lymphocytes, was found (Fig. 7). In the centres of spleen nodules of non-stressed rats in series A, the reticular cells predominated over large and medium-sized lymphocytes; on the other hand, the centres in series B contained a well-formed zone of large and medium-sized lymphocytes and a zone of reticular cells.

*Discussion.* Stress response of the adrenal cortex differed in both series of rats. However, even the starting state of the rats of both series was different as judged by the blood lymphocytes level, by the activity of centres of spleen lymphatic nodules and by the lipid content of the zona fasciculata. Regarding the low lipid content of fasciculata, we may suppose a high initial peripheral glucocorti-

[5] M. Block, V. Smaller, and J. Brown, J. Lab. clin. Med. *42*, 145 (1953).

coid level in rats of series B. Therefore the fasciculata of their adrenals might respond to stress in a less intensive way than those of series A, where, on the contrary, a lower initial glucocorticoid level could be supposed. The lipid depletion of glomerulosa took place only in the case of intensive stress reaction of fasciculata. Deducing from SELYE's[6] conception of reciprocal function of gluco- and mineralocorticoids, we may suppose the reaction of glomerulosa in series A to compensate the overshooting stress reaction of the fasciculata. The stimulus to the mineralocorticoid secretion probably came from the tissue changes, especially from the changes in their physical chemical state, caused by glucocorticoids. Our view is supported by an observation of a marked swelling of spleen lymphoid tissue after the hydrocortisone injection in adrenalectomized rats[7], which was far more developed than the lymphoid tissue swelling in series B. This would be expected because the supposed abolishing action of mineralocorticoids did not entirely take place in adrenalectomized ones.

The factors determining the neurohumoral state of both series of rats could not be defined more precisely. We consider the influence of the diurnal cycle itself to be almost improbable. Beside it, both the season and the temperature of the surroundings must exercise some influence.

M. HILL, M. POSPÍŠIL, and K. DVOŘÁK

*Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Brno and Biophysical Institute of the Academy of Sciences in Brno (Czechoslovakia), June 3, 1958.*

*Zusammenfassung*

Zwei Serien Ratten wurden durch Formalininjektion belastet. Die Zona glomerulosa der Nebennierenrinde reagierte durch Lipoidausscheidung nur in jener Serie, die durch hohe Lymphozytenzahl des Blutes, hohen Lipoidgehalt der Fasciculata, kleinere Aktivität der Lymphknötchen der Milz und auffallend intensive Stressreaktion der Fasciculata charakterisiert war. Bei Ratten, deren Glomerulosa ihre Lipoide ausgeschieden hatte, trat weder Schwellung noch Desintegration des lymphatischen Gewebes der Milz auf.

[6] H. SELYE and G. HEUSER, *Annual report on stress 1955–1956* (New York 1956).

[7] M. HILL, unpublished observation.

## The Action of Cortisone on the Embryonic Cartilage and Muscle *in vitro*

Cortisone exerts an inhibitory action on the growth of rats[1] and produces marked abnormalities in the newly formed cartilage and bone[2]. These effects of the hormone could be derived from its known suppressing action on the development of all the elements of mammalian connective tissues[3]. Inhibition of growth by cortisone has also been shown in the chick embryo[4] and its anti-inflammatory effect on chorio-allantoic grafts[5]. The question has, therefore, been raised whether such effects could be attributed to a direct action of the hormone on bone growth or else are intermediate through some other endocrines or the general metabolism.

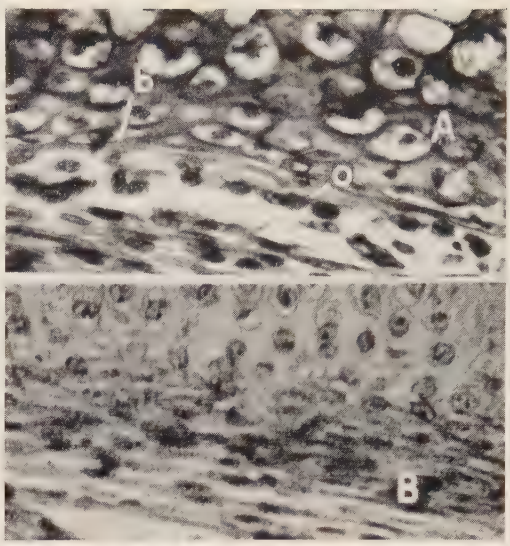



Fig. 1.—Longitudinal sections through femora of 6-day chick embryos, cultivated for 8 days: *A* – on horse serum-ascitic fluid medium and *B* – on a similar medium with cortisone added. H.-E. × 900, *o* = osteoblasts; *b* = bone material.

In the experiments reported here, the effect of cortisone on femora from 6-day chick embryos cultivated by the liquid medium-cellulose membrane procedure on a heterologous medium[6] were studied.

Cortisone* in the amount of 0·02 mg/ml was added to the liquid culture medium. Thus the action of the hormone was direct upon the cartilageneous rudiment of the femur, precluding interjacent factors. In total 32 cultures were grown, 16 on media containing cortisone throughout the whole period of experimentation and 16 without the hormone, as controls. Both femora of one embryo were cultivated in the different media, thus possible individual differences were excluded.

*Results.* The effects of cortisone were manifested in the retardation of growth of the whole rudiment, and in the bending of the explants which occurred more often in the treated cultures than in the controls. Histologically the untreated explants showed the typical developmental changes of the embryonic cartilage *in vitro* most exactingly described by Fell[7]. After the 8th day of cultivation the diaphyseal cartilage showed a marked hypertrophy (Fig. 1 A), characteristic of the stage preceding the penetration of the cartilage by the connective tissue of the periosteum *in vivo*. The cells were swollen into vesicles and the interstitial substance between them became thin and calcified. On the surface of the diaphysis a continuous layer of cells appeared suggesting a row of osteoblasts associated with the formation of osseous tissue (Fig. 1 A, *o*). A thin but distinct band of bone material was formed around the diaphysis (Fig. 1 A, *b*).

[1] B. B. WELLS and E. KENDALL, Proc. Staff Meet. Mayo Clin. *15*, 324 (1940).

[2] R. H. FOLLIS, jr., Proc. Soc. exp. Biol. Med. *76*, 722 (1951).

[3] CH. RAGAN, *Connective tissues* (First Conference, J. MACY, jr. 1950).

[4] D. A. KARNOFSKY, L. P. RIDGEWAY, and P. A. PATTERSON, Endocrinology *48*, 596 (1951). – G. L. SAMES and J. H. LEATHEM, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *78*, 231 (1951). – H. SOBEL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *97*, 495 (1958).

[5] H. SOBEL, Bull. Res. Counc. Israel *4*, 249 (1954).

[6] H. SOBEL and H. LEURER, Exper. *14*, 213 (1958).

[7] H. B. FELL and R. G. CANTI, Proc. Roy. Soc. [B] *116*, 316 (1934).

* Cortisone-acetate in dry powder form was kindly supplied by CIBA AG., Basel.

Fig. 2

In the cortisone treated explants the diaphyseal cartilage is not suggestive of undergoing the hypertrophic changes, characteristic of the preosteogenetic processes. The cells appear small and nonvesicular; the interstitial matrix is abundant, homogeneous and pale staining. In accordance no osteoblasts and no bone material were found in the diaphysis up to the eigth day of cultivation (Fig. 1*B*).

Quite an unexpected result was obtained in the experiments in regard to muscle development. Myoblasts develop in tissue cultures out of the mesenchyme which accompanies sometimes the explanted cartilagineous or procartilagineous anlage[8]. In our experiments in some cultures, cortisone treated as well as controls, a certain amount of undifferentiated mesenchymal tissue was explanted alongside with the cartilagineous rudiments. After 2 to 4 days *in vitro* mononuclear and polynuclear myoblasts appeared in the cultures. The myoblasts formed in separate foci along the cartilage but most frequently they were located around the diaphysis. They appeared first as cylindrical structures but soon they stretched and became spindle-shaped. The formation of the polynucleated myoblasts seems to proceed most often through multiplication of the nuclei not accompanied by division of protoplasm as evidenced by myoblasts in which several nuclei are concentrated in the mid-section of the spindle-shaped cell. On the other hand in some places fusion of several cells occurred indicated by the scattered position of the nuclei in the myoblast.

No differences could be ascertained after the first days of cultivation between the cortisone treated and control cultures in regard to the histogenesis of the muscle cells. But after the 8 h day in the cortisone containing cultures a distinct cross striation, characteristic of skeletal muscle tissues, appeared in some well developed myoblasts (Fig. 2). High power examination revealed that the striation was already double that is to say consisted of the precursors of the 'A' as well as 'Z' disks. Such striation was not found in the controls of similar age.

*Comment.* Our findings corroborate the results obtained by Buno & Goyena[9] on plasma clot cultures as far as the retardation of growth is concerned. In the present experiments, however, different histological changes were observed, in the developing cartilage of the cortisone treated and the control cultures. The typical hypertrophy of the cartilage, preceding the ossification processes, occurred in the control cultures but was retarded or interfered with in the cortisone treated explants. Consequently differentiation of osteoblasts and deposition of bone material was arrested. The results obtained point towards a direct, growth retarding, action of cortisone on developing cartilage and bone. On the other hand the hormone seems to exert a promoting effect on the histotypical differentiation of muscular tissue, since cross striation of the myofibrils appeared in the cortisone treated cultures. This effect of the hormone on embryonic myoblasts could be only partially compared to its known action on differentiated muscles[10].

We wish to thank Mrs. J. Kidron for some excellent slides and Mr. E. Kriss for microphotograhy.

H. Sobel and O. Freund

*Department of Zoology, Hebrew University, Jerusalem (Israel), June 12, 1958.*

*Zusammenfassung*

Cortison verzögert das Wachstum von embryonalen Femur-Anlagen und hemmt die hypertrophische Entwicklung des Knorpels *in vitro*, fördert aber die Differenzierung der gestreiften Myoblasten.

[8] A. Moscona and H. Moscona, Bull. Res. Counc. Israel *3*, 197 (1953).

[9] W. Buno and H. Goyena, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *89*, 622 (1955).

[10] H. Selye, *Textbook of Endocrinology* (Montreal 1948).

## Psychotogenic and Hallucinogenic Properties of Large Doses of Benactyzine

Secondary effects after the administration of Benactyzine have been known in psychiatry for some time[1]. But not even after large doses, were psychoses with hallucinations and impaired consciousness noted[2].

One of us had the opportunity to observe an accidental intoxication with ca. 1400 mg Benactyzine, taking the course of an amental deliriant psychosis with visual hallucinations[3].

As a result of this observation, we tried to evoke an experimental psychosis by means of large doses of Benactyzine, 50–200 mg, in eight volunteers.

In all instances, we investigated the possible effect of Benactyzine on the serotonin metabolism by estimating the 5-hydroxyindolyl acetic acid (5-HIAA) excretion in the urine using the method described by Udenfriend *et al.*[4] in specimens of urine collected 24 h before and 24 h after the administration of Benactyzine. In two instances we investigated the 17-ketosteroid excretion using a modification of Henry and Thérenet's method[5].

*Results.*—Seven subjects developed a psychosis lasting 4–12 h. In the forefront there were visual hallucinations, illusions, disturbances of spatial vision, impaired con-

[1] E. B. Davies, Brit. med. J. *1*, 480 (1956).

[2] E. Jacobsen, Dan. med. Bull. *2*, 159 (1955).

[3] M. Vojtěchovský, in print in Acta psych. neurol. scand.

[4] S. Udenfriend, E. Titus, and H. Weissbach, J. biol. Chem. *216*, 499 (1955).

[5] R. Henry and M. Thérenet, Bull. Soc. Chim. biol. *33*, 1617 (1951).

sciousness, abnormal behaviour with catatonic features, and floccilation. As far as somatic symptoms are concerned, hypodynamia, ataxia, apraxia, dysarthria, and mydriasis were in the forefront.

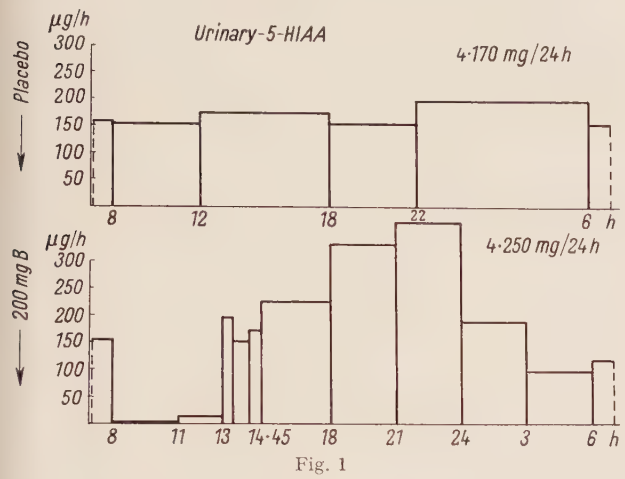



Fig. 1

Changes in the 5-HIAA excretion of one subject are shown in Figure 1. The changes found in the other experimental persons were of similar nature as far as the HIAA excretion and its relation to psychotic changes is concerned. Changes in the 17-ketosteroid excretion are shown in Figure 2.

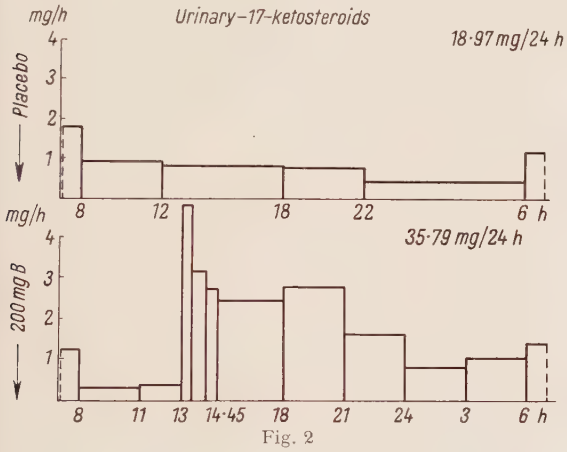



Fig. 2

*Discussion.* Doses of 50 mg and 200 mg Benactyzine caused in all instances a symptomatic psychosis of the exogenous type as described by Bonhoefer, with hallucinations, illusions, impaired consciousness, and catatonic features in the behaviour. Motor changes were of a similar type as described in other publications after smaller doses of the drug.

According to the contemporary theory on psychoses[6], the observed psychotogenic effect of Benactyzine may be explained by its interference with the synaptic transmission due to its cholinergic action as well as its interference with serotonin metabolism. Evidence of an impaired serotonin metabolism is provided by the lowered 5-HIAA excretion in the urine and the marked agreement of these changes with the psychotic symptoms. So far it remains hypothetical whether the decarboxylation of 5-hydroxytryptophan is impaired or whether the oxidative deamination of serotonin is blocked. These considerations require further experimental evidence. The total excretion of 5-HIAA in 24 h was, however, not substantially affected. Factors of diuresis do not play any role under our conditions. Our results do not agree with those observed by Berger *et al.* in animals[7].

The decrease of 17-ketosteroids in the two cases investigated also runs parallel with the maximum of psychotic changes. It can probably be explained by the potent anticholinergic action of Benactyzine. The subsequently increased excretion of 17-ketosteroids is probably due to stress, commonly found also in other experimental psychoses[8].

M. Vojtěchovský,
and V. Vítek, K. Ryšánek, H. Bultasová

*Institute for Human Nutrition Prague (Laboratory for Higher Nervous Activity) and Department for Experimental Therapy of the Chair of Internal Medicine, Institute of Postgraduate Medical Training, Prague, June 5, 1958.*

*Zusammenfassung*

Benactyzin in Dosen 50–200 mg löste bei 7 Versuchspersonen experimentelle Psychose mit gleichzeitiger Herabsetzung von 5-Hydroxyindolylessigsäure im Harn aus. Die psychotogene Wirkung wird mit dem Eingriff in den Serotonin- und Acetylcholinmetabolismus erklärt.

[6] M. Rinkel and H. C. Solomon, J. clin. exp. Psychopathol. *18*, 313 (1957).

[7] F. N. Berger, G. L. Campbell, C. D. Hendley, B. J. Ludwig, and T. E. Lynes, Ann. N. Y. Acad. Sci. *66*, 686 (1957).

[8] H. Hoagland, Ann. N. Y. Acad. Sci. *66*, 445 (1957).

## PRO LABORATORIO

### Acceleration of Drying of Biological Material from the Frozen State by the Use of High Frequency Dielectric Heating

In vacuum drying from the frozen state, of either histological specimens or large volumes of biological materials such as plasma proteins, it is necessary to supply the thermal energy needed for the sublimation of ice. Otherwise, the continued removal of heat (more than 600 calories/g of water) lowers the temperature of the material to a point where the vapor pressure of the ice is so low that drying proceeds at an extremely slow rate, possibly lengthening the drying time from a few hours to over a day. Systems of supplying energy that are dependent on the conduction of heat through the material or on the contact of electrodes have the disadvantage of possible local overheating and rapid drying near the origin of the energy, creating a layer of dried material that acts as an insulating barrier which prevents the further penetration of energy. Some of these problems can be overcome by supplying the necessary energy in the form of infra-red radiation[1] which will penetrate the walls of the container without heating them unduly and yet heat the sample, but energy supplied in this way may still heat the already dried material sufficiently to damage it. In theory, an ideal method of supplying energy would be the use of ultra high fre-

[1] W. H. Zamzow and W. R. Marshall, Jr., Chem. Eng. Progr. *48*, 21 (1952).

quency radio energy[2] to heat the material, since no contact with a heating element or electrode is needed; and if the proper wavelengths are employed, the resulting dielectric heating should occur only in those portions of the material containing water and not in the dried material or in the walls of the container.

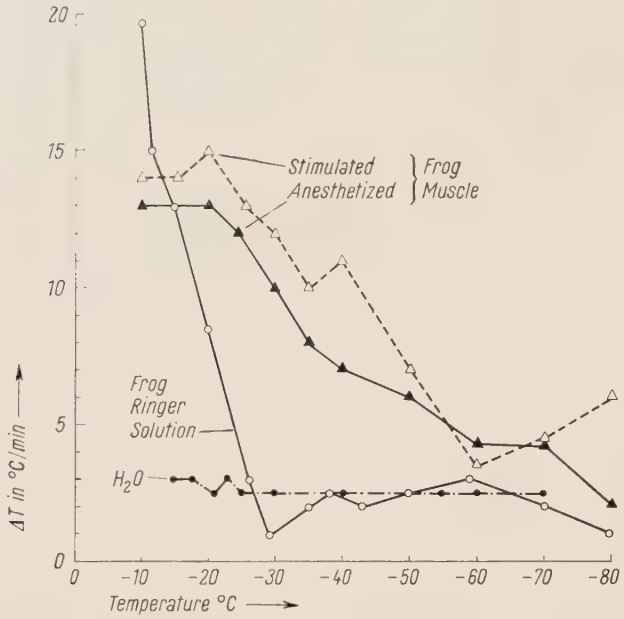



Fig. 1.—Dielectric heating of $H_2O$, frog Ringers solution, and frog sartorius muscle at different temperatures produced by 30-cm radio waves. At each temperature the high frequency power was turned on for 1 min and the change in temperature recorded. Power to antenna, 10 watts. The material was initially frozen in liquid nitrogen.

The drying apparatus was similar in design to that used by Jansen[3]. It consisted of a U tube trap which was immersed in liquid nitrogen; one arm of the trap led to a vacuum pump, while the other was connected to a vacuum guage and carried in the thermocouple wires which led to a recording galvanometer. In operation, a tissue sample with a diameter of about 3 mm was impaled upon the thermocouple, and frozen in liquid nitrogen or cold isopentane; the apparatus was rapidly assembled, and the vacuum pump started. The high frequency radio energy was generated by a 'Radar' oscillator which was tuned to a wavelength of about 30 cm ($1 \times 10^9$ cycles/s). The power was conveyed through a coaxial cable to a small antenna, one end of which was hooked around the drying apparatus at the same level as the tissue. The power being transmitted, as indicated by a watt meter in the cable, was controlled by changing the power input to the transmitter.

In an attempt to elucidate the mechanism of dielectric heating of biological materials at these wavelengths and temperatures, uncomplicated by the extraction of heat that occurs *in vacuo*, heating rates were studied at atmospheric pressure as a function of temperature. The heating of muscle does not appear to be due only to the absorption of energy by pure ice, which is very small, or to the absorption which occurs in salt solutions due to ionic conductivity (Fig. 1). The frequency is rather high and the temperature too low for the absorption to be due to the relaxation of protein dipoles. Probably the best explanation for dielectric heating under these conditions is that the energy is being absorbed by bound water, as Freymann[4] has suggested. This is further supported by the fact that both wet cellulose as well as sugar solutions have heating curves similar to muscle.

The amount of heating that occurs at a fixed power input and a fixed temperature in the process of drying is a function of the rate at which heat is being removed by the sublimation of ice (Fig. 2). At a pressure of 1 atmosphere, the heating is very rapid since there is little sublimation. However, at low pressures, during the early phases of drying when the escape of water vapor from the surface is very rapid, the heating effect is much less marked due to the rapid extraction of heat. Later in the drying process, the shell of dry material which surrounds the remaining ice inhibits the rate of sublimation, and rapid heating occurs when the power is applied. Finally, when the material is completely dry, there is no heating at all. In practice, the power is adjusted so that the tissue is held at a fixed temperature during the course of drying.

Histological examination of tissue sections taken from material which had been dried with the aid of dielectric heating showed no evidence of artifact formation due to exposure to the radio energy. There was no evidence of localized overheating either at the surface or in the center. The tissue did not show any tendency to explode due to internal vapor pressure nor was there any evidence of ionization discharge seen, two technical difficulties which Greaves[2] suggested might occur with the use of dielectric heating. The possibility that heating in this way might cause protein denaturation was investigated by drying small frog muscles with the aid of dielectric heating and studying the contraction which occurs when they are re-

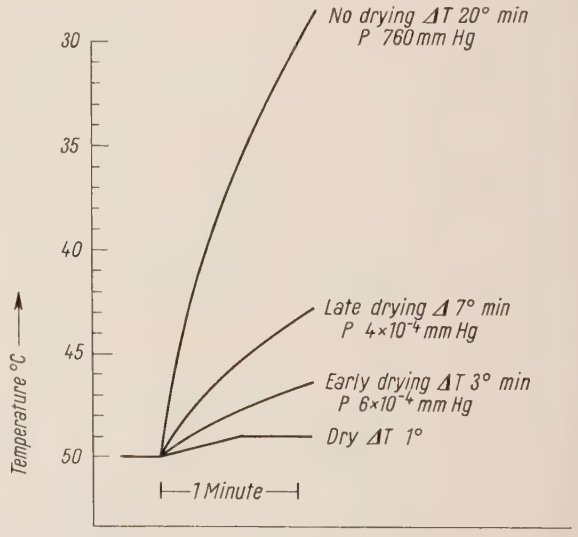



Fig. 2.—Superimposed tracings from a recording galvanometer showing variation in heating rates of muscle produced by a 1-min exposure to radio energy at — 50° C at different times in the drying cycle. Power to antenna, 30 watts.

hydrated. In all cases, the rehydration contraction was identical with that seen in muscles which had not been heated in this way during drying and similar in most respects to the contraction of living muscle[5], indicating

[2] R. I. N. Greaves, in *Biological Applications of Freezing and Drying* (Academic Press, New York 1954), p. 87.

[3] M. T. Jansen, Exp. Cell Res. *7*, 318 (1954).

[4] M. Freymann and R. Freymann, J. Phys. Radium *15*, 165 (1954).

[5] A. L. Hopkins, Fed. Proc. *14*, 75 (1955); J. cell. comp. Physiol. *51*, 67 (1958).

that exposure to high frequency radio energy has not denatured the proteins of the contractile system. The possibility that this might occur due to resonant absorption of the dry proteins[6] led to the abandonment of the use of microwaves which were employed in the preliminary phases of this study[7]. Most routine drying of tissue and plasma proteins can be done in the temperature range of efficient heating for these wavelengths although it is somewhat high to prevent completely the formation of histological artifacts. If the same relationship exists between wavelength and temperature of maximum absorption as exists in silica gel[4], then the use of an oscillator generating longer wavelengths should be capable of heating tissues at lower temperatures. Even with the present equipment it has been possible to reduce the time required to reach complete dryness by more than one half, as indicated by a modification of the technique described by PATTEN[8].

This work was made possible by the generous loan of the necessary equipment from the Bird Electronic Corporation of Cleveland (Ohio).

A. L. HOPKINS

*Department of Anatomy, Western Reserve University, Cleveland (Ohio), June 12, 1958.*

*Zusammenfassung*

Die dielektrische Heizung mittels 30-cm-Funkwellen kann gebraucht werden, um die Trocknung von biologischem Material in gefrorenem Zustand zu beschleunigen. Diese Wellenlängen heizen nur jenen Teil des Materials, welcher Wasser enthält, und erwärmen oder verletzen das trockene Material nicht.

[6] B. COMMONER, J. TOWNSEND, and G. E. PAKE, Nature *174*, 689 (1954).
[7] A. L. HOPKINS, Anat. Rec. *127*, 310 (1957).
[8] S. F. PATTEN, JR., and A. L. HOPKINS, Exp. Cell Res. *14*, 647 (1958).

## PRO LABORATORIO

## A Convenient Cell for the Determination of the Electrophoretic Velocity of Microscopic Particles

Two forms of cell have been commonly used for determining the electrophoretic velocity of suspended particles by the microscopic method. The all-glass *flat* cell of ABRAMSON[1] is excellent but is very difficult, and therefore expensive, to construct and is fragile. (*Cemented* flat cells are unsatisfactory because of the considerable danger of contamination.) The cylindrical all-glass cell of MATTSON[2] is easier to construct but has certain disadvantages. Firstly, an optically clear 'window' must be ground and polished on the upper side of the cell and, unless the grinding is carried almost to the inner bore and the polishing is of good standard, it is impossible to get particles near the bottom of the cell in clear focus. Secondly, the optical resolution for very small particles is necessarily poor because of the presence of the plano-cylindrical lens formed by the wall of the tube. Thirdly, the lens effect also introduces an important focussing error in measurements of the positions of particles within the cell[3]. It is highly desirable to determine the velocity of particles at a series of accurately known depths from top to bottom of the cell in order to obtain a correct elimination of electro-osmotic flow (for theory and examples see ABRAMSON *et al.*[1]).

A modified cylindrical cell which overcomes these difficulties with little loss of precision and which can readily be constructed in any laboratory is described below. Except for a tiny cemented window, it is constructed throughout of sealed 'Hysil' or similar resistance glass.

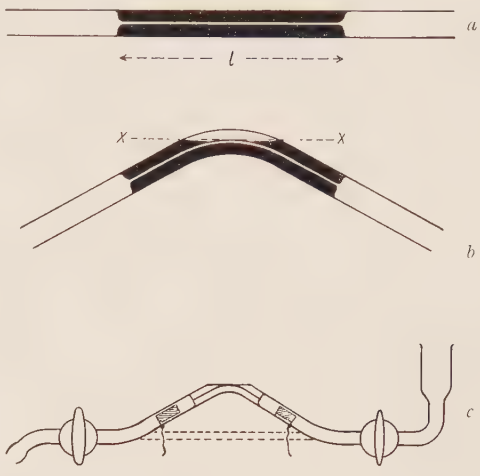



Fig. 1.—Construction of electrophoresis cell

A 5-cm length of precision-bore (e.g. 1 mm) capillary tube is first joined to wider tubing, as in Figure 1*a*, and the length of capillary *l* determined. The capillary is then bent at the middle into an arc of radius about 2·5 cm until the two ends make an angle of about 120° C (Fig. 1*b*). Great care is taken to avoid constricting the bore, and to this end a close-fitting soft copper wire can be inserted before bending and be pulled out afterwards.

Next, the corner of the bend is ground away along the plane *xx* by pressing it against a rotating glass plate carrying coarse carborundum powder moistened with water. When the glass has been ground almost down to the inner wall, the carborundum is changed to a fine grade and the grinding carried on cautiously, with frequent inspections, until a very small hole is pierced into the inner bore, when the grinding is stopped. The hole should be no larger than will fill the field of view of the microscope to be used (e.g. 4-mm objective, with 20× eyepiece). On to this hole a small piece of thin microscope cover-glass is sealed – for example, with Canada balsam – to form a window. This allows particles to be seen at any depth with perfect definition and no focussing error.

The cell is completed by bending the side tubes and fitting cylindrical platinized platinum foil electrodes, small stopcocks and arrangements for filling and emptying as shown in Figure 1*c*. Two glass rods (not shown) are also sealed across either side of the bend to strengthen it. It is convenient to connect the electrodes to platinized bands deposited on the outsides of the tubes and to solder light connecting leads to these bands.

[1] H. A. ABRAMSON, L. S. MOYER, and M. H. GORIN, *Electrophoresis of Proteins* (Reinhold Publishing Corp., New York 1942).
[2] S. MATTSON, J. phys. Chem. *32*, 1532 (1928); *37*, 223 (1933).
[3] A. M. BUSWELL and T. E. LARSON, J. phys. Chem. *40*, 833 (1936). – D. C. HENRY, J. chem. Soc. *1938*, 997.

The cell is mounted on a special adjustable stand on the microscope stage so that the window can be located exactly in the field of view. The whole cell can be cleaned by short treatments with chromic acid, since attack on the balsam is slight and it is easy to replace the window from time to time. There is very little contact between the balsam and the solution in the cell and hence the danger of contamination is minimized. Suspensions can be introduced into the cell without removing it from the microscope.

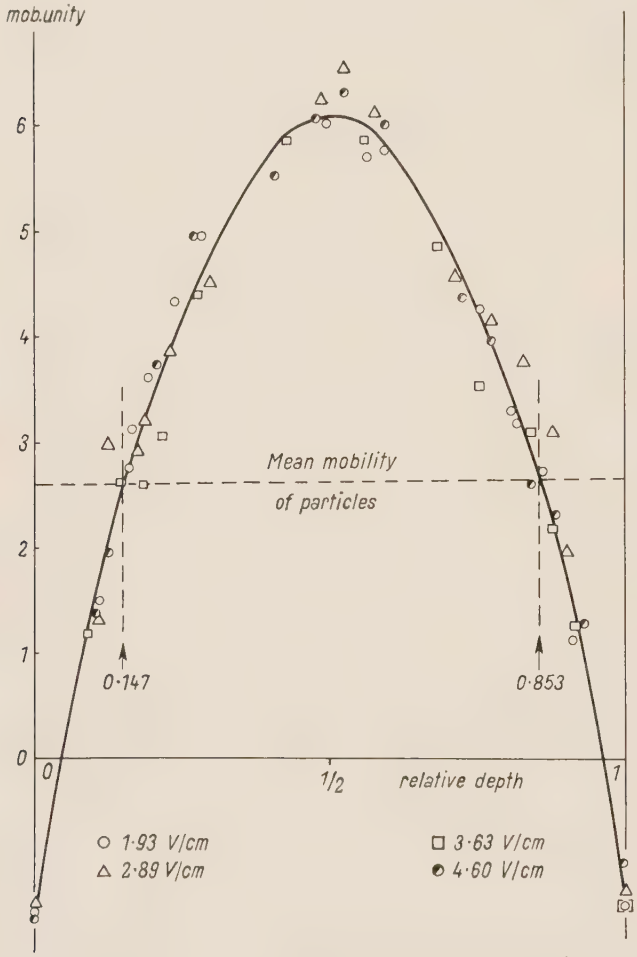



Fig. 2.—Mobility for different fieldstrengths in $KNO_3 10^{-4}$ *N*

In use, about 25 volts from a dry-battery gives a suitable rate of electrophoresis. The potential gradient is calculated from the applied voltage and length of the capillary with a small correction for the potential drop along the wider parts of the tube. (Alternatively, Abramson's method of determining the gradient can be used[1].) The platinum electrodes are suitable for work with dilute solutions up to about $2 \times 10^{-2}$ *N*; for more concentrated solutions the usual non-gassing electrode systems must be employed.

In carrying out a determination, the top and bottom of the cell are first located in the microscope and their readings on the microscope's fine-adjustment micrometer noted. The velocities of migration of particles at different depths are then determined, taking a mean of repeated timings back and forth on reversal of the field. A graph of mobilities as a function of depth is plotted and the mobilities at the 'stationary levels' (0·147 and 0·853 of the diameter from the sides) read off (Fig. 2). The two values may differ by several per cent because of the curvature of the tube, but their mean will be sufficiently close to the correct value for a straight tube.

In all electrophoretic work with very dilute solutions it is advisable to repeat each series of determinations with a fresh portion of suspension to check against the possibility of contamination. Results reproducible to about ± 2% can be readily obtained with this apparatus.

Our thanks are due to the Schweizerische Nationalfonds for a grant to one of us (J. H. S.).

J. H. Schenkel and J. A. Kitchener

*Chemistry Department, Imperial College, London, July 28, 1958.*

*Zusammenfassung*

Es wird eine modifizierte Glaselektrophoresezelle von zylindrischem Querschnitt beschrieben, die in jedem Laboratorium leicht hergestellt werden kann. Der Vorteil der Modifikation hinsichtlich der Fokussierung und der Beweglichkeit wird besprochen.

## PRO EXPERIMENTIS

### Culture *in vitro* d'un tissu nymphal de lépidoptère

Les processus de pathogénèse ou de métabolisme, sont de plus en plus étudiés sur cultures de cellules *in vitro*. De telles recherches sont envisagées depuis peu sur les insectes en raison de l'augmentation constante du nombre de leurs affections pathologiques connues.

Les tentatives de culture de tissus d'invertébrés sont peu nombreuses et un développement cellulaire n'a été que rarement observé[1]. Chez les insectes, l'émigration et la multiplication de fibroblastes ont été notées à partir de gonades femelles de larves.

Nous avons essayé de réaliser la culture de tissus provenant de nymphes de lépidoptères. Ce stade de la métamorphose représente en effet, un état physiologique particulier (lyse tissulaire accompagnée de phagocytose et formation des organes de l'imago, notamment de ceux de la reproduction).

Les cultures réalisées à partir de chrysalides du Lépidoptère *Bombyx mori* L., ont été faites en gouttes pendantes, en micro-tubes plats et en flacons à surface plane permettant l'observation pendant la culture[2].

Le milieu très simplifié comprend pour 100 g d'eau bidistillée:

| | |
|---|---|
| $NaH_2PO_4$ | 100 mg |
| $MgCl_2 6H_2O$ | 300 mg |
| $MgSO_4 7H_2O$ | 350 mg |
| KCl | 300 mg |
| $CaCl_2$ | 100 mg |
| $NaHCO_3$ | jusqu'à pH 6,5–6,7 |
| Glucose | 100 mg |
| Hydrolysat de lactalbumine | 500 mg |
| Pénicilline | 20000 UI |
| Streptomycine | 5 mg |

Cette solution est complétée de 10% d'hémolymphe de larves ou de nymphes de *B. mori*. Les chrysalides sont

[1] P. Bohuslav, Arch. exp. Zellforsch. *14*, 139 (1933). – J. B. Gatenby, J. Hill et T. J. Macdougald, Quart. J. micr. Sci. *77*, 129 (1935). – W. Trager, J. exp. Med. *51*, 501 (1935). – C. Vago, *Mikroskopie*, 1958 (en cours d'impression). – C. Vago et S. Chastang, Exper. *14*, 110 (1958). – S. S. Wyatt, J. gen. Phys. *39*, 841 (1956).

[2] C. Vago, *Mikroskopie*, 1958 (en cours d'impression).

conservées à 15° C pendant les 9 jours suivant leur formation, soit jusqu'à la fin de la lyse cellulaire afin d'obtenir le maximum de sang et le moins de débris possible.

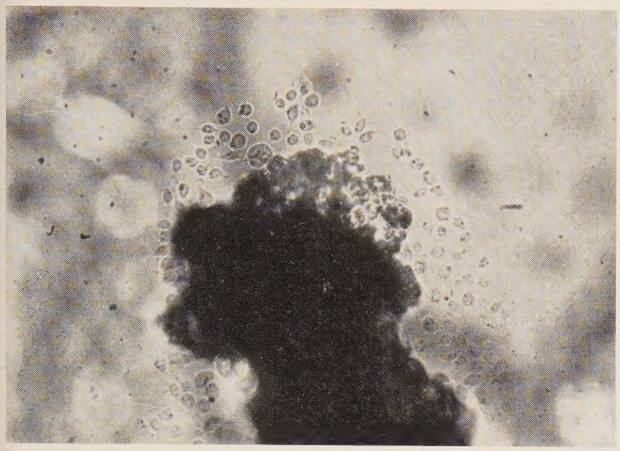


Fig. 1. Culture d'ovaire nymphal *Bombyx mori* L. 48 h. Emigration de fibroblastes et de cellules fusiformes. Contraste de phase: 850×.

L'hémolymphe est collectée en ampoules sans précautions d'asepsie. Elle est chauffée ensuite à 60° C pendant 5 min afin d'inactiver la tyrosinase et de permettre la filtration et la centrifugation à 7000 t/min pendant 20 min. Le surnageant est employé de plusieurs façons. Il peut être immédiatement mélangé au milieu et filtré avec celui-ci sur bougie Chamberland $L_3$ afin d'obtenir un milieu complet. Il peut également être filtré seul et conservé en ampoules scellées à 4° C pendant plusieurs mois. Dans ce cas, au moment de la préparation du milieu, il sera ajouté à ce dernier filtré à part. On peut enfin le congeler à – 20° C et le filtrer avec le milieu au moment de l'emploi.

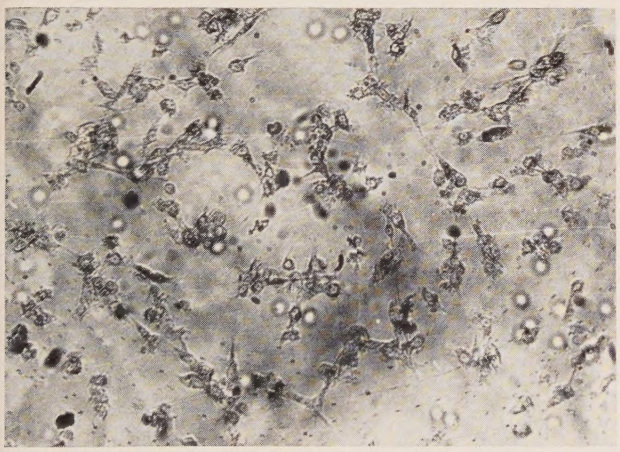


Fig. 2. La même culture au bout de 6 jours. Couche homogène de fibroblastes. Contraste de phase: 850×.

Le tissu mis en culture est un fragment d'ovaire prélevé aseptiquement sur chrysalide de formation récente quand les œufs ne sont encore que faiblement développés. La partie mince de la chaîne ovarienne est découpée aseptiquement en très petits morceaux dont le diamètre est inférieur à 1 mm.

Les explants d'ovaire conservent leurs mouvements de contraction pendant plus d'un mois. L'émigration des cellules commence au bout de 15 h et persiste avec augmentation d'intensité périodique après chaque changement de milieu.

Les cellules forment un halo autour des fragments et couvrent au bout de 5 jours une plage correspondant à deux fois celle de l'explant. Après 11 jours, une grande surface est recouverte d'une façon homogène (Fig. 1 et 2).

Ces cellules sont du type fibroblaste. Elles conservent quelquefois une forme ovoïde ou fusiforme avec pseudopodes ramifiés et courts. La forme «fibroblaste» prédomine lorsque la culture s'étale sur une surface plane et le type «fusiforme» lorsque les cellules s'accumulent à la surface du milieu (Fig. 1). Notons que les cellules sont également fusiformes ou piriformes lorsqu'elles sortent du tissu ovarien pour émigrer dans le milieu. Elles s'arrondissent pendant la mitose.

A l'heure actuelle, les cultures ont été maintenues pendant plus de 40 jours avec changement de milieu tous les 4–5 jours. Le repiquage a également été réalisé.

Signalons que nous avons aussi obtenu la culture du tissu ovarien de nymphes, en employant comme milieu l'hémolymphe filtrée pure sans la mélanger à une solution physiologique. La contraction des fragments d'ovaire se maintient plusieurs semaines. L'émigration de fibroblastes et de cellules fusiformes est observée, mais les cellules sont assez vacuolisées.

La culture du tissu ovarien des nymphes de lépidoptères semble avoir un intérêt particulier pour le développement des méthodes de cultures de tissus d'insectes car les chrysalides offrent une source de tissus, disponible pendant une période sans doute variable selon les espèces, mais toujours incomparablement plus longue que les larves. Cet avantage est complété par la possibilité de stocker la matière première sans inconvénients, d'une part du fait de la diapause nymphale existant chez certaines espèces, d'autre part, grâce à la conservation à une température basse (4° C). Cet aspect est particulièrement intéressant pour les cultures en couches monocellulaires, possibilité en cours d'étude chez les invertébrés, que nous traiterons ultérieurement.

C. Vago et S. Chastang

*Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Cytopathologie, Alès (France), le 7 juillet 1958.*

*Summary*

Using a simplified medium, the composition of which is described in the text, cell cultures (fibroblast type) were obtained from nymphal ovarian tubes of *Bombyx mori*. The change in the form between fibroblasts and spindle cells is described. The preservation of activity of haemolymph congealed to – 20° C for a long time is shown; the advantages of using nymphs for cultivating tissues in virological series are also noted.

## INFORMATION

### Corrigendum

H. M. Hirsch: *Tumor-Isoimmunity*. Exper. *14*, fasc.8, 269 (1958). The last sentence of the first paragraph from above, on page 270, second column, should read:

'Antigens not present in normal host tissues have been reported in carcinogen-induced tumors by Zil'ber *et al.*[20], and Nartissov and Zil'ber[21], and Weiler[22] has reported that rat liver cell carcinoma lacked a liver-specific antigen.'

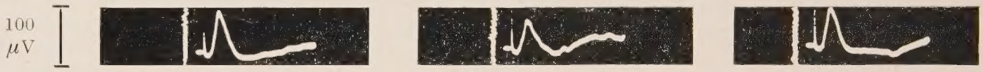
# Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

## A Central Nervous System Effect of a Non-Hallucinatory Lysergic Acid Derivative

By M. A. Spirtes, Paul S. Guth*, and E. H. Polley**

The effect of serotonin (5-HT) on smooth muscle and other peripheral sites is antagonized by certain lysergic acid derivatives, among them D-lysergic acid diethylamide (LSE-25) and 2-brom-D-lysergic acid diethylamide (BOL-148)[1]. Marrazzi and Hart[2] have demonstrated a central synaptic inhibitory action of 5-HT in small doses, indicating a possible role for 5-HT in regulating impulse transmission. The competition between 5-HT and the lysergic acid derivatives was proposed as the mechanism underlying the central nervous system actions of LSD-25, a powerful hallucinatory agent[3]. However, BOL-148 has no such hallucinatory ability[4] although it was shown to be as potent if not a more potent antagonist than LSD-25 of the actions of 5-HT peripherally. It occurred to us that BOL-148 might be competing with 5-HT at the synapse, and that it is possibly just as potent an inhibitor of central synaptic transmission as 5-HT. Therefore, if 5-HT, the *normal* inhibitor, is replaced by an equally potent inhibitor, there should be no marked deviation from the normal situation, and no hallucinatory effect. We felt it to be of interest to investigate the effect of BOL-148 on central synaptic transmission. A transcallosal evoked potential method similar to the Marrazzi and Hart[2] modification of the Curtis and Bard[5] method was used.




*Control* *Effect* *Recovery*

Fig. 1. — Films of the oscilloscope face demonstrating the heights of the post-synaptic potentials before, during, and after the inhibitory effect of 200 mcg/kg of BOL-148 injected into the carotid artery ipsilateral with the recording electrodes.

When BOL-148 is injected into the carotid artery of a cat anesthetized with pentobarbital, it produces a marked inhibition of the evoked negative postsynaptic response in the monosynaptic corticocortical (trans-callosal) pathway as represented in Figure 1. This is interpreted as a depression of synaptic transmission in this system[5]. The inhibition occurs approximately thirty seconds after the injection of 100–500 mcg per kg of BOL-148. When the negative post-synaptic potential has returned to control level, it has been our experience in several experiments, that the synaptic transmission is temporarily unresponsive to previously-depressing doses of 5-HT or LSD-25. Figure 2 demonstrates the reduction of 5-HT action after the injection of BOL-148. The antagonism to the synaptic inhibitory effects of these compounds after BOL-148 injection may last as long as forty-five minutes. This effect is being studied at present and will be reported upon more fully in the future.

The actions of BOL-148 in central synapses and on peripheral organs are apparently similar. At both sites of action, BOL-148 blocks the effect of 5-HT. 5-HT exhibits different actions at the two sites, stimulating the peripheral organs in question[1] while inhibiting central synaptic transmission[2]. BOL-148 blocks both 5-HT stimulation of peripheral organs[6] and apparently, 5-HT inhibition of central synaptic transmission. The possible interaction between 5-HT and LSD-25 in this system is also under investigation, although it has been claimed that LSD-25 does not interact with 5-HT in central synapses[7].

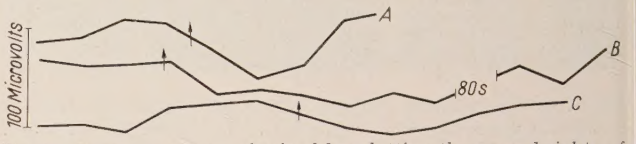



Fig. 2.—These curves are obtained by plotting the mean heights of each series of ten successive post-synaptic potentials (P.S.P.'s) against the mean times for these P.S.P.'s.

It is difficult to state specifically which of the synaptic inhibitors under discussion (5-HT, LSD-25 or BOL-148) is most powerful in this regard, because of permeability, breakdown, affinity for receptors and other factors. However, from the data obtained by studying the effects of the lysergic acid derivatives and their competition with 5-HT on peripheral organs it would seem that BOL-148 is a more potent competitor than LSD-25[8]. BOL-148 and serotonin may be equally potent inhibitors of synaptic transmission, so that replacement of a normally-occurring inhibitor, serotonin, with one of possibly equal potency, Bol-148, produces no great change from the normal and hence, no hallucinatory action. We realize that this speculation is an extreme oversimplification.

The research reported in this communication was supported in part by U. S. Public Health Grant M-2362.

*Zusammenfassung*

Ähnlich wie Serotonin und LSD-25 vermindert BOL-148, ein Lysergsäurederivat, das keine Halluzinationen erzeugt, die durch den Balken fortgeleiteten, postsynaptischen Potentiale. Vorbehandlung mit BOL-148 macht das Versuchstier für ungefähr eine Stunde unempfindlich gegen Serotonin. BOL-148 blockiert anscheinend im Zentralnervensystem wie auch in der Peripherie den Serotonineffekt. Es wird versucht, zu erklären, weshalb diese Droge keine Halluzinationen bewirkt.

* Fellow of Smith, Kline & French Fdn., Phila., Department of Pharmacology, Hahnemann Medical College, Phila.

** Department of Anatomy, Hahnemann Medical College, Phila.

[1] J. H. Gaddum, J. Physiol. *121*, 15 (1953). – K. H. Ginzel and S. R. Kottegoda, Quart. J. exp. Biol. *38*, 285 (1953). – J. H. Gaddum, C. O. Hebb, A. Silver, and A. A. B. Swan, Quart. J. exp. Biol. *38*, 255 (1953). – J. H. Welsh, Nature *173*, 955 (1954). – I. H. Slater, K. H. Davis, D. E. Leary, and E. S. Boyd, J. Pharmacol. exp. Therap. *113*, 48 (1955). – A. Cerletti and E. Rothlin, Nature *176*, 785 (1955). – H. Herxheimer, J. Physiol. *128*, 435 (1955). – A. Cerletti and H. Konzett, Arch. exp. Path. Pharmacol. *228*, 146 (1956).

[2] A. S. Marrazzi and E. R. Hart, Science *121*, 365 (1955).

[3] J. H. Gaddum, J. Physiol. *121*, 15 (1953).

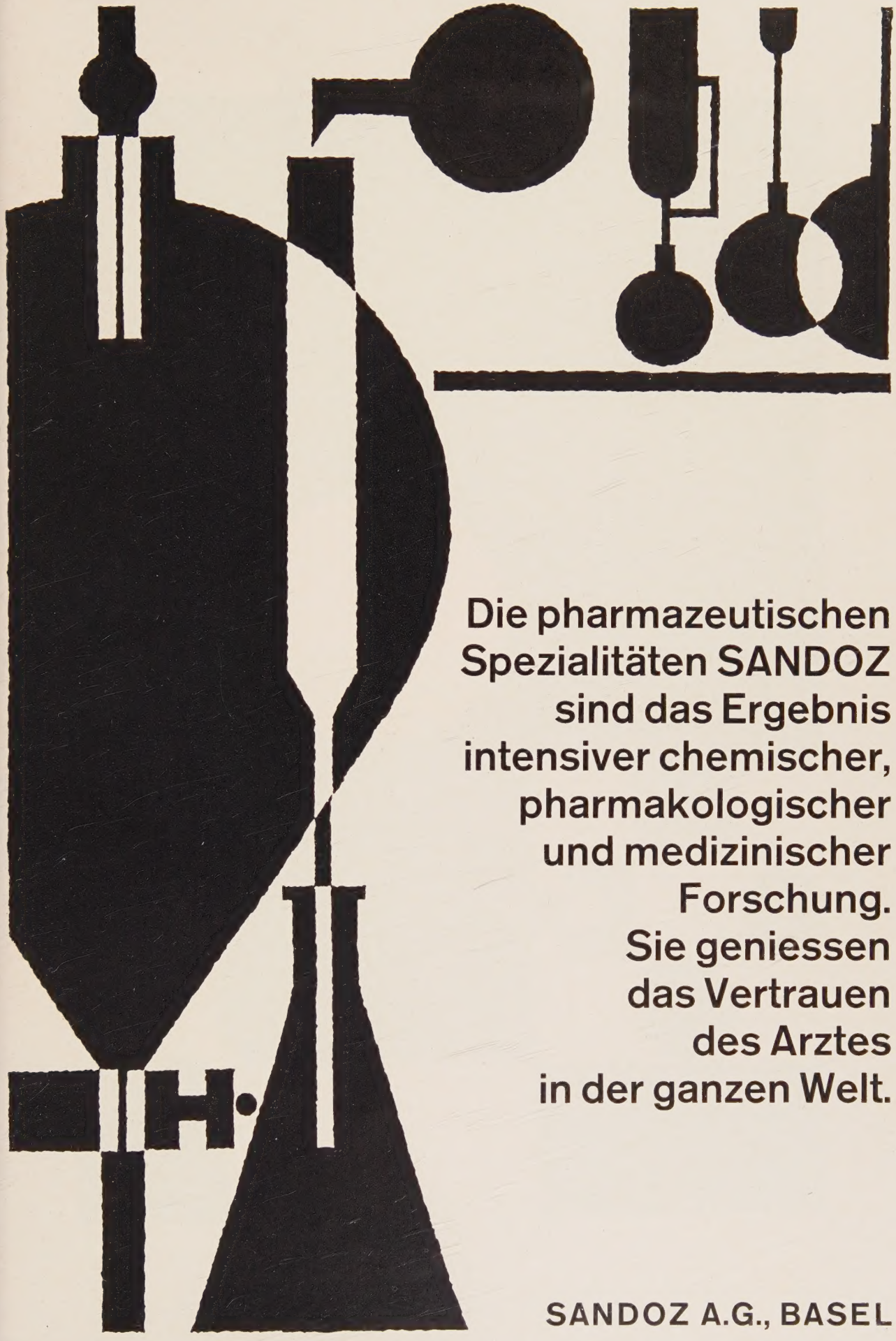
[4] A. Cerletti and E. Rothlin, Nature *176*, 785 (1955).

[5] H. S. Curtis and P. Bard, Amer. J. Physiol. *126*, 473 (1939).

[6] J. H. Welsh and A. C. McCoy, Science *125*, 348 (1957). – G. C. Salmoiraghi, J. W. McCubbin, and I. H. Page, J. Pharmacol. exp. Therap. *119*, 240 (1957). – J. H. Gaddum and Z. P. Picarrelli, Brit. J. Pharmacol. *12*, 323 (1957).

[7] D. P. Purpura, Ann. N. Y. Acad. Sci. *66*, 515 (1957).

[8] A. Cerletti and H. Konzett, Arch. exp. Path. Pharmacol. *228*, 146 (1956).



Die pharmazeutischen
Spezialitäten SANDOZ
sind das Ergebnis
intensiver chemischer,
pharmakologischer
und medizinischer
Forschung.
Sie geniessen
das Vertrauen
des Arztes
in der ganzen Welt.

SANDOZ A.G., BASEL

**Clichés Schwitter AG**

**Basel**
Allschwilerstrasse 90
Telefon 061 38 88 50

**Zürich**
Stauffacherstrasse 45
Telefon 051 25 67 35